

ER-residente Reaktionen der Protein *N*-Glykosylierung:

**Charakterisierung in Hefe und Mensch
zur biochemischen Analyse
Kongenitaler Störungen der Glykosylierung
(Congenital Disorders of Glycosylation, CDG)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III -
Biologie und vorklinische Medizin
der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus A. Schwarz
aus Mengkofen

Regensburg 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 07.11.2003

Tag des Kolloquiums: 17.12.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. L. Lehle

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. H. Tschochner

Erstgutachter: Prof. Dr. L. Lehle

Zweitgutachter: Prof. Dr. E. Holler

Drittprüfer: Prof. Dr. C. Steinem

Hypothesen sind Netze;

nur der wird fangen,

der auswirft.

Novalis

Inhaltsverzeichnis

Akronyme	1
Einleitung	3
Ergebnisse und Diskussion	18
I Experimente zum N-Oligosaccharyltransferase-Komplex aus <i>S. cerevisiae</i>	21
I.1 Untersuchungen zur Zusammensetzung des OST-Komplexes im Hinblick auf die Untereinheiten Ost3 und Ost6	21
I.1.1 Der Wachstumsphänotyp einer <i>OST6</i> -Disruption bezüglich Temperatur sowie Coffein bleibt unbeeinflusst von einer <i>OST3</i> -Überexpression	21
I.1.2 Ost3p und Ost6p – strukturell ähnliche Untereinheiten der OST: Untersuchungen zu möglichen Auswirkungen von deren Überexpression bzw. Deletion auf die Zusammensetzung des Komplexes	26
I.1.2.1 „SDS-PAGE“ und „Western“-Analyse: Die Überexpression von <i>OST3</i> führt zum fast vollständigen Verschwinden von Ost6p – in Umkehrung nur stark abgeschwächt	26
I.1.2.2 „Blue Native PAGE“ und „Western“-Analyse des OST-Gesamtkomplexes: Hinweise auf die Existenz ausschließlich Ost3p und ausschließlich Ost6p enthaltender OST-Komplexe	28
I.2 Ein neues Solubilisierungsverfahren für den OST-Komplex aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
II Synthese von Lipid gebundenen Oligosacchariden in Hefe	37
II.1 Optimierung der DolPP-GlcNAc ₂ -Synthese	37
II.1.1 Kinetik der Reaktionen im NP40-Solubilisat und Verwendung des <i>gpi1-1</i> -Stamms	37
II.1.2 Ermittlung des optimalen Detergens/Protein-Verhältnisses	39
II.2 Entwicklung einer Methode zur selektiven und präparativen Dol-PP-GlcNAc ₁ -Synthese	41
II.2.1 Inhibition der GlcNAc-Transferase (GNT) durch UDP	41
II.2.2 Synthese von Dol-PP-GlcNAc ₁ über DHPC/Hochsalz-Solubilisierung	42
II.3 Optimierung der Solubilisierung der UDP-GlcNAc:GlcNAc ₁ -PP-Dol GlcNAc-Transferase-Aktivität (GNT) sowie Charakterisierung des Enzyms	47
II.3.1 Proteinabhängigkeit	47

II.3.2	Stabilität	47
II.3.3	Weitere Parameter zur GNT-Aktivität	48
II.4	Entwicklung von <i>in vitro</i> -Verfahren für die Mannosylierung von DolPP-GlcNAc ₂	50
II.4.1	DHPC-Solubilisierung und DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ -Produktion	51
II.4.2	Versuche der Verlängerung von DolPP-GlcNAc ₂ bzw. DolPP-GlcNAc ₂ -Man ₁	52
II.4.2.1	Effiziente Synthese von DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ in GNT-Solubilisat	53
II.4.2.2	Entwicklung einer „Synthetischen Upper phase“ für das CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O 2:1:1-System (UP 2:1:1)	53
II.4.2.3	Zusammenfassung weiterer Solubilisierungsversuche und Schlußfolgerungen für künftige Experimente	55

III Synthese von Lipid gebundenen Oligosacchariden in humanen Fibroblasten und „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) 59

III.1	Aufbau eines Tests für die humane GPT-Transferase (Alg7p _{hum}) aus Fibroblastenmembranen	59
III.1.1	Optimierung der Solubilisierungsbedingungen	59
III.1.2	Kinetik der solubilisierten GPT-Aktivität	60
III.1.3	Stimulierung der humanen GPT durch DolPMan	62
III.2	Die GNT-Reaktion im Solubilisat humaner Fibroblasten	63
III.3	Aufbau eines <i>in vitro</i> Tests zur Verlängerung von DolPP-GlcNAc ₂ bzw. DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁	65
III.3.1	Verlängerung von endogen in Membranen vorhandenem Dolicholphosphat über DolPP-GlcNAc ₂ zu DolPP-GlcNAc ₂ Man _x	65
III.3.2	Entwicklung einer geeigneten Solubilisierungsmethode zur Verlängerung von DolPP-[¹⁴ C]GlcNAc ₂ Man ₁	67
III.3.3	Kinetik der Reaktionen DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ bis DolPP-GlcNAc ₂ Man ₅ im Fibroblastensolubilisat	69
III.3.3.1	Optimierung der Reaktionsparameter und Kinetik der Reaktionen DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ bis DolPP-GlcNAc ₂ Man ₅ im Solubilisat von Kontrollfibroblasten	69
III.3.3.2	Vergleichskinetik der DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ -Verlängerung im Solubilisat aus Kontrolle und Patient	72
III.4	Suche nach Wegen zu einem definierten DolPP-GlcNAc ₂ Man ₂ -Substrat	74
III.4.1	Irrwege	74
III.4.1.1	Versuch der Inhibierung der α1,3-Transferase mit GDP	74
III.4.1.2	Taurocholat-Solubilisierung	75
III.4.1.3	Schwermetall-Inhibierung	76
III.4.2	Gewinnung von DolPP-GlcNAc ₂ Man ₂ über Partialverdau von DolPP-GlcNAc ₂ Man ₅ mit <i>Jack bean</i> α-Mannosidase	76
III.4.3	Nachweis der Identität des aus <i>Jack bean</i> α-Mannosidaseverdau gewonnenen DolPP-GlcNAc ₂ Man ₂ als DolPP-GlcNAc ₂ β1,4Manα1,6Man	77
III.5	Ein neuer CDG-Fall, Subtyp II: Identifizierung und biochemische Charakterisierung als Defekt im humanen ALG2 Gen	78
III.5.1	Im Enzymsolubilisat aus Patientenzellen ist die Verlängerung von DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ zu DolPP-GlcNAc ₂ Man ₂ defekt	78

III.5.2	Das defekte Patientengen ist das humane Ortholog zum <i>ALG2</i> aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
III.5.3	Im Solubilisat aus Fibroblasten mit einem defekten humanen <i>ALG2</i> ist die α 1,3-Mannosyltransferase betroffen	83
III.6	CDG Ig: Identifizierung eines neuen CDG-Subtyps mit einem Defekt im humanen Alg12p	85
IV	Weitere Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung unbekannter humaner Glykosylierungsdefekte (CDGs)	89
IV.1	Grundsätzliche Parameter und Vorgehensweisen	89
IV.1.1	Optimierung von Zellernte und Zellaufschluß	89
IV.1.2	Abhängigkeit der OST-, der GPT- sowie der GNT-Aktivität von der Zellkulturdauer und Festlegung der methodischen Parameter	89
IV.1.2.1	Abhängigkeit der Aktivität von GPT und GNT von der Kulturdauer	90
IV.1.2.2	Abhängigkeit der OST-Aktivität von der Kulturdauer	91
IV.1.2.3	Festlegung der methodischen Parameter für die Zellkultur	92
IV.2	Die Oligosaccharyltransferaseaktivität in Fibroblasten	93
IV.3	Ein CDG-Fall mit mutiertem <i>RPN2</i> : Polymorphismus oder OST-Defekt im Patienten „DE“ ?	96
IV.3.1	Untersuchungen zur Oligosaccharyltransferase-Aktivität mit kurzkettigen LLO-Intermediaten	96
IV.3.2	Test mit Vollängen-LLO-Substrat und entsprechende Modifizierung der Aufarbeitungstechnik	98
IV.3.3	Analyse der LLO-Synthese des CDG-Patienten „DE“: Defekt in der DolP-Man-Synthase sowie der β 1,4-Mannosyltransferase	99
IV.3.3.1	Patient „DE“ zeigt normale GPT-Aktivität sowie Stimulierbarkeit der GPT durch DolP-Man	99
IV.3.3.2	Patient „DE“ weist normale GNT-Transferaseaktivität auf	101
IV.3.3.3	Patient „DE“ weist deutlich reduzierte DolP-Man-Synthaseaktivität auf	102
IV.3.3.4	Die Verlängerung von DolPP-GlcNAc ₂ zu DolPP-GlcNAc ₂ Man ₅ ist im Patienten „DE“ deutlich reduziert	102
IV.3.3.5	Im Patienten „DE“ sind die Aktivitäten der α -Mannosyltransferasen von DolPP-GlcNAc ₂ Man _{1–5} normal, der Defekt liegt in der β 1,4-Mannosyltransferase	104
IV.3.4	CDG-Patient „DE“: Diskussion des biochemischen Phänotyps	104
	Zusammenfassung	107
A	Methoden	111
A.1	Kulturbedingungen	111
A.1.1	Kulturbedingungen für <i>E. coli</i>	111
A.1.2	Kulturbedingungen für <i>S. cerevisiae</i>	111
A.1.3	Zellkultur humaner Fibroblasten bzw. Lymphoblasten	111
A.1.3.1	Kulturbedingungen für humane Fibroblasten	111
A.1.3.2	Kulturbedingungen für humane Lymphoblasten	113
A.2	Biochemische Methoden	114

A.2.1	Häufig verwendete Puffer und Lösungsmittelgemische	114
A.2.2	Mikrosomenpräparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	114
A.2.2.1	Glasperlenaufschluß	114
A.2.2.2	Spheroblastierung nach L. Lehle	115
A.2.3	Membranpräparation aus primären humanen Fibroblasten	116
A.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	116
A.2.5	„Western-Blot“-Analyse	117
A.2.6	„Blue Native Page“ und „Western Blotting“	117
A.2.7	Lipidoligosaccharid-Markierung mit [³ H]-Mannose	118
A.2.8	Präparative und analytische Mannosidase-Verdaue	118
A.2.8.1	Präparativer LLO[³ H]Man ₅ -Verdau durch <i>Jack bean</i> α -Mannosidase zur LLOMan ₂ -Gewinnung	118
A.2.8.2	Analytischer α 1,3-Verdau des durch mildsaure Hydrolyse vom Dolicholrest abgetrennten Tetrasaccharids	119
A.2.8.3	Analytischer α 1,6-Verdau des durch mildsaure Hydrolyse vom Dolicholrest abgetrennten Tetrasaccharids	119
A.2.8.4	Analytischer β 1,4-Verdau des präparativ hergestellten, präsumptiven DolPP[¹⁴ C]-GlcNAc ₂ β 1,4Man	119
A.2.9	Metabolische Markierung von Hefen und Immunpräzipitation von CPY bzw. Invertase	120
A.2.9.1	Markierung mit [³⁵ S]-Methionin und Zellaufschluß	120
A.2.9.2	Immunpräzipitation	120
A.2.10	Enzymatische Reaktionen <i>S. cerevisiae</i>	122
A.2.10.1	Solubilisierung der Oligosaccharyltransferase aus <i>S. cerevisiae</i>	122
A.2.10.2	<i>N</i> -Oligosaccharyltransferasetest	122
A.2.10.3	Synthese von DolPP[¹⁴ C]-GlcNAc ₁	124
A.2.10.4	Synthese von DolPP[¹⁴ C]-GlcNAc ₂	125
A.2.10.5	Solubilisierung der GNT-Aktivität/ β 1,4-Mannosyltransferaseaktivität und GNT-Test	126
A.2.10.6	Synthese von DolPP[¹⁴ C]-GlcNAc ₂ Man ₁	127
A.2.10.7	Synthese von kaltem DolP-Man [nach C. B. Sharma]	128
A.2.11	Enzymatische Reaktionen humaner Fibroblasten	129
A.2.11.1	<i>N</i> -Oligosaccharyltransferasetest	129
A.2.11.2	Bestimmung der gekoppelten Aktivität von GPT (Alg7p) und GNT in Mikrosomen	129
A.2.11.3	Verlängerung endogenen DolPs mit UDP-[¹⁴ C]GlcNAc und in der Folge GDP-Man	130
A.2.11.4	Bestimmung der GPT-Aktivität im Mikrosomensolubilisat	130
A.2.11.5	Bestimmung der GNT-Aktivität im Mikrosomensolubilisat	132
A.2.11.6	Bestimmung der DolP-Man-Synthaseaktivität in Rohmembranen humaner Fibroblasten	133
A.2.11.7	Bestimmung der Mannosyltransferaseaktivitäten bis LLOM ₅ im Mikrosomensolubilisat	133
A.2.11.8	Präparative LLOM ₅ -Synthese aus DolPP[¹⁴ C]GlcNAc ₂ und GDP-Man	134
A.2.11.9	Bestimmung der Mannosyltransferaseaktivitäten von LLOM ₆ bis LLOM ₉ in Mikrosomenmembranen	135

A.3	Analytische Methoden	135
A.3.1	HPLC von Oligosacchariden	135
A.4	Molekularbiologische Methoden	136
A.4.1	Transformation von <i>E. coli</i> , Elektroporation	136
A.4.2	Transformation von Hefen, Elektroporation	136
A.4.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	137
A.4.4	Vektorkonstrukt für die <i>S. cerevisiae alg2-1</i> -Transformation mit hALG2 bzw. Δ 1040G hALG2	137
B	Material	139
B.1	Chemikalien und Enzyme	139
B.2	Spezielle Geräte	140
B.3	Organismen und Plasmide	140
	Abbildungsverzeichnis	142
	Tabellenverzeichnis	145
	Literaturverzeichnis	147

Akronyme

ALG	Asparagine Linked Glycosylation
Anti	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin
C/M/H	CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O, vol/vol/vol
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CFW	Calcofluor white
Ci	Curie
cmc	kritische mizellare Konzentration
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CPY	Carboxypeptidase y
DHPC	Diheptanoyl-Phosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DolPP	Dolicholpyrophosphat
DolP	Dolichol-Phosphat
DPAP B	Dipeptidylaminopeptidase B
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
Glc	Glucose
GPI	Glykosylphosphatidyl-Inositol
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	Kontrolle
LLOM _x	DolPPGlcNAc ₂ Man _x
LLO	lipid-linked oligosaccharide
Man	D-Mannose
MAP	Mitogen Activated Protein
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NP40	Nonidet-P40
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei 578 nm
OST	N-Oligosaccharyltransferase
PBS	Phosphate buffered saline
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
Pkc	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
UDP	Uridindiphosphat
U	„Units“, Einheit für enzymatische Aktivität
WT	Wildtyp

Einleitung

Die N-Glykosylierung von Asparaginresten naszierender Polypeptidketten im Lumen des ER ist eine der verbreitetsten Proteinmodifikationen unter den Eukaryonten. Unter Prokaryonten finden sich vergleichbare Vorgänge bei Archaeen [77], dagegen nur ausnahmsweise bei Eubakterien [121].

Vom niederen Eukaryonten wie der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bis zum Menschen konservierte Charakteristika der N-Glykosylierung sind erstens das Auftreten von Dolichol-Phosphat (DolP) als Trägermolekül für die Oligosaccharid-Assemblierung („Festphasensynthese“), zweitens der Transfer des charakteristischen Oligosaccharids $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ und drittens die Erkennung von Asparagin-Resten des Sequons Asn-Xaa-Ser/Thr durch einen in die ER-Membran eingebetteten heterooligomeren Enzymkomplex, der N-Oligosaccharyltransferase, wobei die Amidgruppe des Asparagins als Akzeptor fungiert [8].

Daß die N-glykosidische Modifizierung von Proteinen einen lebensnotwendigen Prozeß für eukaryontische Zellen darstellt, konnte bereits in den 80er Jahren anhand temperatursensitiver Hefemutanten gezeigt werden [37, 38]. Doch erst mit Entwicklung der „knock out“-Technik in Mäusen wurde dies 1994 auch für Säuger bestätigt [40, 87]. Daneben belegt eine ständig steigende Zahl von Glykosylierungsdefekten beim Menschen („Congenital Disorders of Glycosylation“, CDG) mit meist drastischer klinischer Ausprägung die immense Bedeutung dieser Modifikation [26, 46].

Die eukaryontische N-Glykosylierung – ein Überblick

Die Vorgänge im ER: hochkonserviert und homogen Eine Übersicht über die Gesamtheit der ER-lokalisierten Glykosylierungsreaktionen einschließlich der Übertragung auf das Protein ist in Abb. 1 gegeben. Cytoplasmatisch orientiert [1] wird aus DolP und UDP-GlcNAc unter Katalyse des Alg7p (GlcNAcP-Transferase, GPT) DolPP-GlcNAc gebildet. Im Weiteren kommt es zur Verlängerung mit UDP-GlcNAc und GDP-Man bis DolPP-GlcNAc₂Man₅. Nun erfolgt ein „flipping“ des Moleküls auf die luminale Seite der ER-Membran [111]. Wie dieser Prozeß der Translokation des etwa 1.4 kDa großen hydrophilen Oligosaccharid-Rests über die hydrophobe Membran vonstatten geht, ist bislang weitgehend unklar. Für *S. cerevisiae* wurde die Beteiligung des Rft1p als notwendige Voraussetzung für diesen Translokationsprozeß indirekt nachgewiesen [32]. Dieses Protein ist ein integrales Membranprotein mit möglicherweise 12 Membranspannen und Homologen in anderen Eukaryonten [33]. Auf der luminalen Seite angelangt, erfolgt eine weitere Verlängerung mit Mannosen. Der Mannosyldonor ist aber nun DolP-Man (gelbe Mannose-Symbole). GDP-Man ist luminal nicht verfügbar. Daher muß DolP-Man auf der cytoplasmatischen Seite aus GDP-Man und DolP unter Katalyse der DolP-Man-Synthase (DPM1p) gebildet werden (Abb. 1 oben Mitte) – und transloziert werden. Dieser Translokationsprozeß ist zwar unabhängig

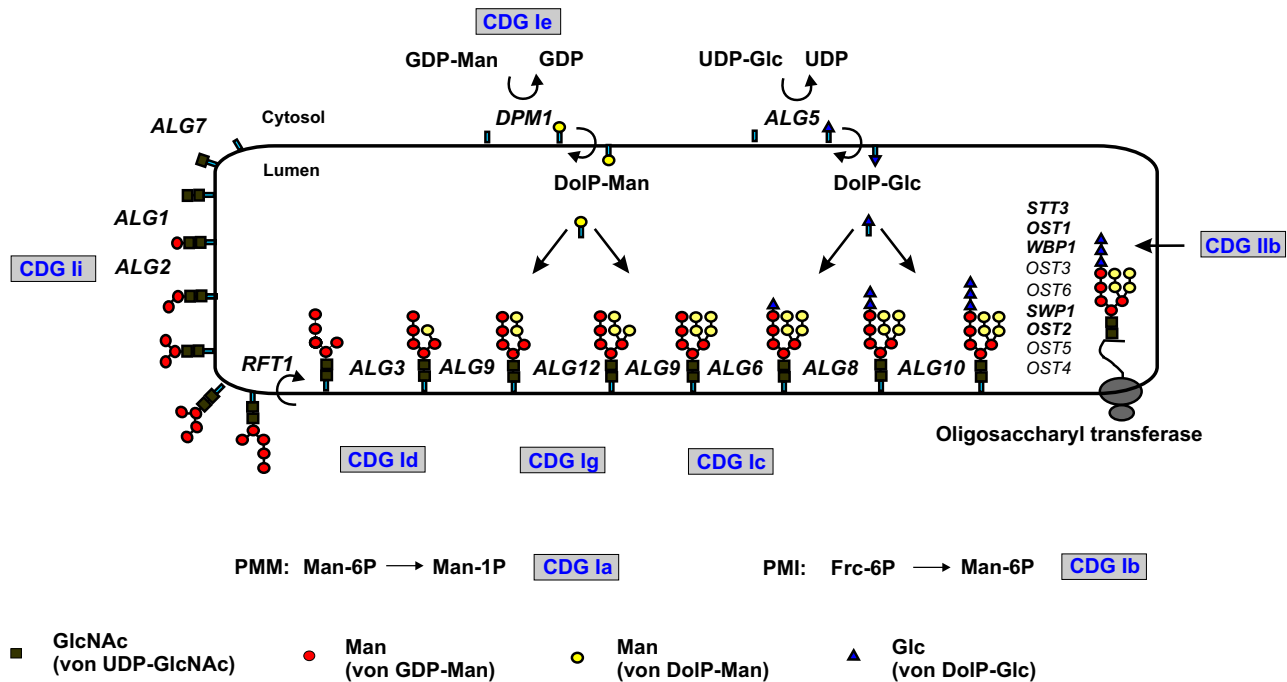


Abbildung 1: Übersicht über die ER-lokalisierten Schritte der N-Glykosylierung unter Berücksichtigung aufgeklärter Fälle des humanen Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) Typ I

Die angegebenen Enzyme beziehen sich auf *S. cerevisiae*, Orthologe im Menschen existieren jedoch für alle bisher untersuchten Fälle, wie anhand der dargestellten CDG-Subtypen ersichtlich ist. CDG Ig und CDG Ii wurden in dieser Arbeit, CDG Ic sowie CDG Id von dieser Arbeitsgruppe untersucht. Die fett gedruckten Untereinheiten der OST sind essentiell.

von *RFT1* [32], aber auch proteinabhängig [99]. Unklar ist, ob entweder eine eigene Translokase existiert, oder aber die luminal aktiven, DoIP-Man- bzw. DoIP-Glc-abhängigen, Mannosyltransferasen auch den Transmembrantransport ihres Substrats bewerkstelligen. Denn diese Transferasen weisen durchweg zahlreiche Transmembranspannen auf – wahrscheinlich eine notwendige Voraussetzung für einen derartigen Translokationsprozeß. Dagegen scheint eine Translokaseaktivität der DoIP-Man-Synthase selbst inzwischen ausgeschlossen [105]. Der auf diese Weise bis $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9$ angewachsene Oligosaccharidrest wird nun weiter um drei Glucosereste verlängert. Obwohl UDP-Glucose innerhalb des ER verfügbar ist, ist DoIP-Glc der Donor für diese Reaktionen und wird wie DoIP-Man cytoplasmatisch orientiert synthetisiert aus UDP-Glc und DoIP unter Katalyse von Alg5p. Auch hier ist eine proteinabhängige Translokation gezeigt, die wahrscheinlich unabhängig von der DoIP-Man-Translokation ist [100]. Mit Abschluß des Transfers des dritten Glucose-Rests ist das „core“-Oligosaccharid komplett und damit Substrat für die Oligosaccharyltransferase, einem Multienzymkomplex des rauen ER, der in enger Assoziation mit dem Translokon (Sec61-Komplex) [50] bis auf wenige Ausnahmen kotranslational die naszierende Polypeptidkette an den Asn-Resten von Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequenzen glykosyliert.

Diese Vorgänge der „core“-Glykosylierung sind hoch konserviert und finden nahezu in allen eukaryontischen Zellen statt. Da alle N-glykosidisch modifizierten Proteine diesen Prozess durchlaufen, unterscheiden sie sich bis hierhin in ihren Kohlenhydratstrukturen nicht, weshalb die Funktion des Oligosaccharidrestes noch von grundsätzlicher Natur ist. So beeinflusst die N-Glykosylierung entscheidend die Faltung vieler neusynthetisierter Proteine im ER. Bei Inhibierung der Glykosylierung ist die Entstehung von fehlgefalteten, aggregierten Proteinen die Folge. *In vitro*-Faltungsstudi-

en zeigen den positiven Einfluß der Oligosaccharide auf den Faltungsprozeß. Sie sorgen für eine bessere Löslichkeit der noch unvollständig gefalteten Proteine und verhindern so ein Aggregieren. Polypeptidsegmente, die mit Kohlenhydraten modifiziert sind, werden zur Oberfläche von Proteindomänen gelenkt. Die Auswirkungen auf den Faltungsprozeß scheinen sowohl lokal, als auch global zu sein, wobei die Abhängigkeit einzelner Glykoproteine von der Glykosylierung sehr stark variiert [34].

Wahrscheinlich hat diese Art der Glykosylierung den Eukaryonten erst ermöglicht, größere und komplexere Proteine in höherem Umfang effektiv zu produzieren und zu sezernieren. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, muß die Glykosylierung bereits kotranslational, also *vor* der Faltung, erfolgen [34].

Noch während die Proteinsynthese andauert, beginnt bereits die Prozessierung der proteingebundenen Kohlenhydratketten. Glucosidase I und II spalten nacheinander zwei der drei Glucosen ab, und mit der Bindung eines zweier homologer Lectine, Calnexin (membrangebunden) oder Calreticulin (löslich), an diese spezifische Saccharidstruktur beginnt zumindest in höheren Eukaryonten ein als „Qualitätskontrolle“ bekannt gewordener Mechanismus [34, 93]. Während das noch ungefaltete Protein durch die Bindung der Lectine in Lösung gehalten wird, formen sie einen Komplex mit einer Thiol:Protein Oxido-Reduktase/Isomerase, ERp57, die für die ordnungsgemäße Bildung von Disulfidbrücken innerhalb des Substratmoleküls sorgt. Auch klassische ER-Chaperone wie BiP haben Zugang zum zu faltenden Protein. Doch auch ein drittes Protein, die Glucosidase II hat Zugriff. Sie spaltet schließlich die dritte Glucose ab, worauf sich die Bindung zu Calnexin bzw. Calreticulin löst. Sensorfunktion bezüglich korrekter Faltung übt nun die UDP-Glucose:Glykoprotein Glucosyltransferase (GT) aus. Nur unzureichend gefaltete Proteine werden erneut glucosyliert – der Zyklus beginnt von neuem.

Um allerdings „Dauergäste“, chronische Falschfalter also, irgendwann loswerden zu können, scheint ein weiterer Mechanismus zu greifen. Die ER-Mannosidase I spaltet in einer sehr langsam ablaufenden Reaktion die in Abb. 2 mit „9“ gekennzeichnete α 1,2-gebundene Mannose ab [34]. Dies reduziert jedenfalls *in vitro* die Bindungsaffinität zu Calnexin/Calreticulin [93] und die resultierende Man₈-Struktur ist zumindest Teil des Signals für den ER-assoziierten Abbau (ERAD) von Glykoproteinen [34].

Diversifizierung im Golgi Die im ER herrschenden strikten Kontrollmechanismen (die hoch geordnete Abfolge der Glykosylierungsreaktionen beim Aufbau des lipidgebundenen Oligosaccharids sowie die ausgeprägte Präferenz der OST für DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ gegenüber kürzerkettigen Intermediaten, *siehe unten zu beidem*) existieren im Golgi-Apparat in dieser Form nicht. Vielmehr wird hier die weitere Prozessierung durch die in den jeweiligen Kompartimenten vorhandenen Glykosidasen bzw. Glykosyltransferasen bestimmt, verbunden mit einer ausreichenden Verweildauer [34]. Die ausgesprochene Vielfalt der Strukturen kommt einerseits durch Peptid-erkennende Glykosyltransferasen zustande [3, 85], die nur ganz bestimmte Proteine modifizieren. So erfolgt beispielsweise die Modifizierung lysosomaler Enzyme durch die im cis-Golgi Kompartiment lokalisierte GlcNAcP-Transferase. Das nach Abspaltung von GlcNAc verbleibende Mannose-6-P dirigiert diese Proteine nach Erkennung durch Rezeptoren im Transgolgi-Netzwerk über „clathrin coated vesicles“ zu Endosomen.

Andererseits ergibt sich Vielfalt durch gewebe- oder entwicklungsspezifische Expression von Glykosyltransferasen und Glykosidasen. So wird die Bildung einer Vielzahl komplexer Strukturen möglich, die als eigenständige Domänen fungieren können. Dies eröffnet eine neue Dimension der Regulation oder bedürfnisgemäßen Variation von Proteinfunktionen, ohne dabei deren Funktion an sich zu gefährden. Daher sind auch die im Golgi ablaufenden Modifikationen stark spe-

ziesspezifisch und können sogar innerhalb einer Art verschieden sein (Blutgruppen). Evolutionspotential bestand also vorwiegend für die im Golgi ablaufenden Prozesse – die unentbehrlichen ER-spezifischen Aufgaben hinsichtlich des Faltungsprozesses sind hier bereits erfüllt.

Im Einklang damit unterscheidet sich die Golgi-Modifizierung der *N*-gebundenen Oligosaccharidketten in Hefe und Säugern stark. In *S. cerevisiae* erfolgt keine weitere Verkürzung der aus dem ER stammenden GlcNAc₂Man₈-Struktur mehr. Oligosaccharidketten intrazellulärer Mannoproteine erfahren nur noch eine geringfügige Erweiterung zum „inner core“, GlcNAc₂Man_{8–15}, wohingegen extrazelluläre oder sezernierte Proteine einer weiteren Prozessierung unterzogen werden können, was eine an die „inner core“-Struktur geheftete, stark verzweigte „outer chain“ mit bis zu 150 Mannoseeinheiten entstehen läßt [35]. Diese Mannoproteine sind für die Stabilität sowie die Undurchlässigkeit der Hefezellwand gegenüber Makromolekülen von großer Wichtigkeit, wenngleich sie unter Laborbedingungen nicht essentiell sind [19, 63, 78].

Je komplexer allerdings die Organismen im Laufe der Evolution wurden, desto wichtiger war es, die Eigenschaften von Proteinen zell- und gewebespezifisch anzupassen. Ebenso waren Zell-Zell-Erkennungsmechanismen oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen wichtig geworden – als deren Mittel insbesondere eine immer komplexer werdende Glykosylierungsmaschinerie im Golgi diene. So findet in Säugern zunächst im cis-Golgi eine Prozessierung des „core“-Saccharids durch α 1,2-Mannosidasen bis GlcNAc₂Man₅ statt. Dieser „high mannose“-typ bleibt bei einigen Proteinen auch erhalten. In den meisten Fällen erfolgt jedoch die weitere Modifizierung im medialen Golgi durch ein allen Metazoen und Pflanzen, jedoch nicht Protozoen, eigentümliches Schlüsselenzym, der GlcNAc-Transferase I. Dieses Enzym ist das Tor zu sowohl den einfacheren „hybrid type“- als auch den „complex type“-Glykanen. Mäuse mit einem Defekt in diesem Enzym sterben zwischen Tag 9 und 10 der Embryogenese aufgrund Versagens multipler Organsysteme [40, 87]. Vorher ist offensichtlich noch eine Versorgung durch mütterliches Enzym möglich. Dies weist auf den essentiellen Beitrag komplexer Glykane für Zell-Zell-Interaktionen bei der Organogenese hin.

Im Anschluß an diese Modifikation (am GlcNAc₂- β 1,4Man- α 1,3Man-Ast, vgl. Abb. 2) erfolgt ein weiteres „trimming“ durch Mannosidase II im medialen Golgi bis zu GlcNAc₂- β 1,4Man-(α 1,3Man- β 1,2GlcNAc)- α 1,6Man. Noch im medialen Golgi werden dann durch weitere GlcNAc-Transferasen bis zu 3 zusätzliche „Äste“ initiiert (Tetraantennäre Struktur). Galactosyl-, Sialyl- und Fucosyltransferasen sorgen dann unter anderen im trans-Golgi für hochkomplexe Strukturen [20]. Entsprechend haben Defekte in Transferasen des trans-Golgis, am Ende der Kette der Modifizierungen also, relativ spezifische und vergleichsweise milde Defekte. Je weiter am Anfang sie aber stehen, desto drastischer sind die Auswirkungen.

Die Funktionen dieser Modifizierungen im Golgi reichen von längeren Halbwertszeiten im Serum für Hormone (Erythropoietin, Lutropin) [20, 117] über verändertes „clustern“ von T-Zell Rezeptoren oder Zell-Adhäsionsrezeptoren und damit veränderten Aktivierungs-Schwellenwerten [21] bis hin zur Veränderung der neuronalen Plastizität über Addition bzw. Abspaltung von Sialinsäure-Resten von N-CAM [73, 117].

Aufbau des lipidgebundenen Oligosaccharids im ER

Viele der bekannten Gene für die Synthese der von der OST übertragenen lipidgebundenen Oligosaccharidstruktur gehen auf Hefemutanten zurück, die Robbins und Mitarbeiter über eine [³H]Mannose Suizid-Selektion isoliert hatten – *alg*-Mutanten, für „asparagine linked glycosylation“ [37, 38]. Die zum Aufbau des dolicholgebundenen Oligosaccharids führenden Reaktionen sind ausführlich in einem Review von Burda und Aepli beschrieben [8], nur hinsichtlich dort nicht erwähnter De-

tails wird im Folgenden die Originalliteratur zitiert. Soweit nicht anders erwähnt, bezieht sich diese Darstellung auf *S. cerevisiae*, ist aber in allen Eukaryonten hoch konserviert (siehe oben). In Abb. 2 ist schematisch die „core“-Struktur gezeigt. Die Nummern innerhalb der Zuckersymbole bezeichnen die Reihenfolge der Syntheseschritte. Die jeweiligen Bindungstypen zusammen mit den für die einzelnen Transferasen kodierenden Gene sind, soweit bekannt, eingezeichnet.

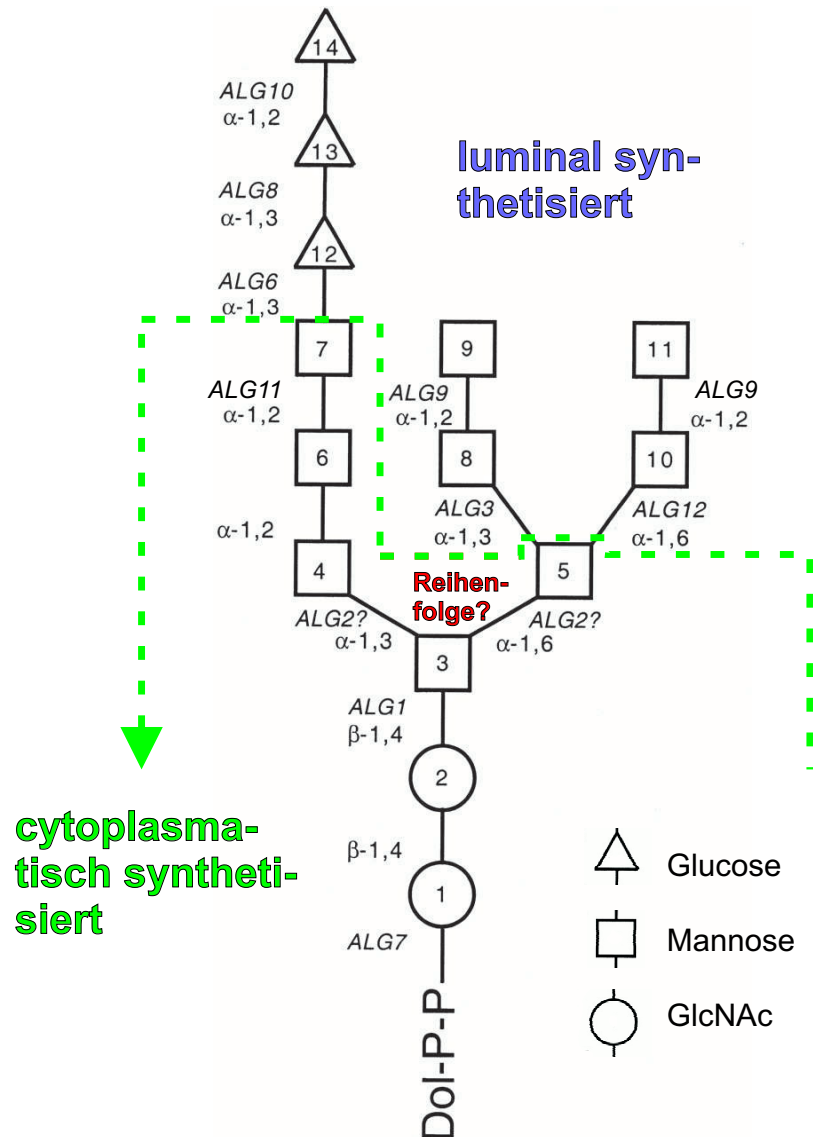


Abbildung 2: Schema des Vollängenoligosaccharidlipids

In Hefe bekannte Gene sind jeweils vermerkt, ebenso der Bindungstyp sowie die Reihenfolge der Synthese (Zahlen in den Zuckersymbolen). Grün gestrichelt abgesetzt ist die auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran aus UDP-GlcNAc und GDP-Man sowie DolP gebildete LLO-Man₅-Struktur, die nach „flipping“ auf die luminal Seite mit DolP-Man und DolP-Glc vervollständigt wird. Das Diagramm wurde entnommen aus [57] und adaptiert.

Die Synthese nimmt ihren Anfang auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran. Zuckernukleotide – UDP-GlcNAc und GDP-Man – sind die Donoren für diese Reaktionen. Das erste En-

zym, GPT (für GlcNAc-Phosphat-Transferase) und kodiert von *ALG7*, ist in zweifacher Hinsicht ungewöhnlich. Einmal katalysiert es die Übertragung von GlcNAc-P auf DolP unter Bildung einer Pyrophosphatbindung zum Lipid. Zum anderen weist es sehr wahrscheinlich zehn Transmembranspannen auf, von denen drei experimentell bestätigt sind [14]. Dadurch unterscheidet es sich deutlich von den nachfolgenden, cytosolisch aktiven Glykosyltransferasen, die – soweit bekannt – nur über 1 bis 3 Membranspannen verfügen. Dies mag mit der Schlüsselstellung am Beginn der Synthesekette und der darauf zurückzuführenden komplexen Regulation dieses Enzyms zusammenhängen. Da der DolP-Pool in der ER-Membran begrenzt ist und auch die DolP-Man-Synthase sowie die DolP-Glc-Synthase DolP benötigen, ist eine fein abgestimmte DolPP-GlcNAc Synthese wesentlich, um eine vollständige luminale Verlängerung durch die DolP-Man und DolP-Glc abhängigen Glykosyltransferasen zu gewährleisten. Tatsächlich konnten die Zellzyklusabhängige Expression [74], DolP-Man- sowie Phospholipidabhängige Stimulierung [53, 54] und nicht zuletzt „feedback“-Inhibierung durch LLO-Intermediate [56, 79] gezeigt werden. Die Transmembranspannen konstituieren möglicherweise die dafür notwendigen Lipidbindedomänen.

Die folgende GlcNAc-Transferase, in dieser Arbeit als GNT bezeichnet, ist nur hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität beschrieben [55, 109] [diese Arbeit], das Gen ist bislang noch nicht identifiziert. Alle Evidenzen sprechen für eine cytoplasmatisch orientierte Katalyseaktivität dieses Enzyms (zusammengefaßt in [14]).

Intensiv studiert ist die erste, β 1,4-spezifische Mannosyltransferase, das Alg1p. Es besitzt eine N-terminale Transmembrandomäne, die jedoch für die Aktivität nicht entscheidend ist. Zwar akzeptiert die Transferase auch Phytanyl-Chitobiose statt Dolichyl-Chitobiose als Akzeptorsubstrat, peptidgebundenes GlcNAc₂ fungiert jedoch nicht als Akzeptor [24, 96].

Wie aus Abb. 2 hervor geht, war bislang nicht nur unklar, für welche Enzymaktivität der von Robbins *et al.* [42] charakterisierte *ALG2*-Locus steht, sondern auch, in welcher Reihenfolge die α 1,3- bzw. die α 1,6-Transferaseaktivitäten wirksam werden. In der vorliegenden Arbeit konnte im Zuge der Aufklärung von CDG II (siehe unten) beides geklärt werden. *ALG2* kodiert die α 1,3-Mannosyltransferase und führt zur Bildung von DolPP-GlcNAc₂Man₂ (Transfer von Rest 4). Erst im Anschluß erfolgt die Bildung der Verzweigung durch die α 1,6-gebundene Mannose (Rest 5) durch ein bislang noch nicht bekanntes Enzym.

Auch der Locus des Enzyms für die sechste Reaktion, die Übertragung der ersten α 1,2-gebundenen Mannose (Rest 6), ist noch unbekannt. Dagegen wurde die folgende α 1,2-Transferase anhand einer Mutante im entsprechenden Gen, *ALG11*, sowie eines *alg11*-Deletionsstamms in *S.cerevisiae* beschrieben [12]. Es ist nicht essentiell, wenngleich auch schlechtes Wachstum sowie temperatur-sensitive Letalität die Folge der Deletion sind. Für Alg11p werden mindestens 3 Membranspannen vorhergesagt und es weist signifikante Homologie zu Alg2p auf, ohne aber durch dieses ersetzt werden zu können [12]. Da in Δ *alg11* neben DolPP-GlcNAc₂Man₄ auch DolPP-GlcNAc₂Man₃ ins Lumen des ER transloziert wird, konnten aus der strukturellen Analyse der lipid- sowie proteingebundenen Intermediate interessante Schlußfolgerungen gezogen werden, welches die Minimalvoraussetzungen hinsichtlich der weiteren Prozessierung durch die folgenden Enzyme sind. In der hier gegebenen kurzen Zusammenfassung werden der Einfachheit halber stellvertretend für die spezifisch gebundenen Zucker einfach die Nummern der Reste genannt, wie sie der Abb. 2 zu entnehmen sind.

Als strukturelle Voraussetzung zur Verlängerung des Mannoserests 5 um die (vier) Mannosereste 8 bis 11 genügt demnach das DolPP-GlcNAc₂Man₃-Intermediat mit den Mannoseresten 3 bis 5 vollauf. Eine notwendige Voraussetzung zur Glucosylierung allerdings ist das Vorhandensein der ersten α 1,2-gebundenen Mannose 6. Es kommt also auch ohne Mannoserest 7 zur vollständigen Glucosylierung.

Für das „trimming“ von Mannoserest 9 durch Mannosidase I nach der erfolgten Übertragung auf Proteine noch im ER scheint das Vorhandensein von Mannoserest 6 zwar vorteilhaft (proteingebunden keine Mannose 9 mehr nachweisbar), aber nicht zwingend (Prozessierung erfolgt, aber nicht quantitativ). Dagegen hängt die „outer chain“-Initiierung im Golgi an Mannoserest 4 durch Och1p vollständig von Mannoserest 6 ab.

Mit dem Transfer des α 1,2-gebundenen Mannoserests 7 durch Alg11p ist der cytoplasmatisch orientiert ablaufende Syntheseteil beendet (die in Abb. 2 grün abgesetzte Struktur ist komplett). Es geht, nach dem oben beschriebenen „flipping“ über die Membran, luminal weiter unter Verwendung der lipidgebundenen Donorsubstrate DolP-Man und DolP-Glc. Hier nun ist die Synthesereihenfolge bezüglich der Mannosylreste klar determiniert. Defizienz in einem Schritt unterbindet die Verlängerung durch die folgenden Transferasen, auch wenn dies theoretisch möglich wäre.

Daß in Hefe *ALG3* die α 1,3-Mannosyltransferase verantwortlich für den Transfer von Mannose 8 kodiert, konnte von Sharma *et al.* [110] klar gezeigt werden. Obgleich $\Delta alg3$ -Zellen DolPP-GlcNAc₂Man₅ akkumulieren, zeigen sie keinen Wachstumsphänotyp. Untersuchungen an Invertase zeigten, daß in $\Delta alg3$ etwa 8 von normalerweise 10 Oligosaccharidketten vorhanden sind, die Unterglykosylierung also nur moderat ist [119]. Darüber hinaus wurde durch einen Glucosidase I-Deletionsstamm offenbar, daß nur 6 % der übertragenen Ketten glucosyliert waren [118]. Zu folgern wäre daraus einmal, daß DolPP-GlcNAc₂Man₅ ein schlechtes Substrat für die Glucosyltransferasen darstellt. Auch für die Glucosidasen scheint dies zuzutreffen. Denn wie ebenfalls an Invertase klar wurde, blieben von diesem glucosylierten Anteil nach der Übertragung auf das Protein häufig eine bis mehrere Glucosen unprozessiert [119].

Zum anderen aber, daß die Hefe-OST DolPP-GlcNAc₂Man₅ mit ausreichender Effektivität auf Proteine überträgt, auch ohne die Glucose-„Kappe“, die generell zu einer wesentlich höheren Transferase-Effektivität führt [52, 108]. Dies scheint anders zu sein bei Säugerzellen [10]. Sowohl für „chinese hamster ovary cells“ unter bestimmten experimentellen Bedingungen als auch für einen Klon von Lymphoma-Zellen mit Block im Schritt von DolPP-GlcNAc₂Man₅ zu DolPP-GlcNAc₂Man₆ wurde die Bildung von DolPP-GlcNAc₂Man₅Glc₃ beschrieben, für letztere auch der Transfer auf Proteine sowie die Prozessierung zu Oligosacchariden des komplexen Typs [10]. In Säugern sind also möglicherweise die Glucosyltransferasen in ihrer Substratspezifität weniger stringent, die Effektivität der OST dagegen möglicherweise stärker von der Glucosylierung abhängig [58].

Die α 1,2-gebundene Mannose 9 wird vom Alg9p übertragen. *alg9*-Mutanten sind völlig unauffällig. Zwar akkumuliert in diesen Zellen DolPP-GlcNAc₂Man₆, das erste endo H-sensitive Oligosaccharid, doch wird dieses Intermediat vollständig glucosyliert und DolPP-GlcNAc₂Man₆Glc₃ ist das auf Protein übertragene Oligosaccharid [11]. Auch die Prozessierung durch die Glucosidasen I und II erfolgt nahezu mit Wildtypaktivität. Die wichtigste Schlußfolgerung daraus ist, daß die durch Alg3p übertragene Mannose 8 die für die Glucosyltransferasen Alg6p, Alg8p und Alg10p sowie auch die Glucosidasen I und II entscheidende strukturelle Information darstellt, die deren Aktivität deutlich steigert [11].

Wie zu erwarten, zeigt auch die *alg12*-Mutante, defekt in der Synthese der α 1,6-gebundenen Mannose 10, nur äußerst schwache Unterglykosylierung. Sowohl DolPP-GlcNAc₂Man₇ als auch DolPP-GlcNAc₂Man₇Glc₃ akkumuliert, und letzteres ist die auf Protein übertragene Spezies. Auch das „trimming“ durch Glucosidasen I und II erfolgt mit WT-Aktivität [13]. Was in dieser Mutante jedoch auffällt, ist die Akkumulation fehlgefalteter CPY im ER, was auf gestörte „ER-associated degradation“ (ERAD) hinweist. In der Tat konnte für *alg12* eine unzureichende Abspaltung von Mannose 9 gezeigt werden, die als eine Art Zeitgeber für das Chaperone-System der

ER-Qualitätskontrolle fungieren soll (vgl. oben). Über 85 % der an Invertase gebundenen Glykane war nicht von ER-Mannosidase I prozessiert worden. Dies impliziert, daß Mannosen 10 und 11 für die Aktivität von Mannosidase I von entscheidender Bedeutung sind [13].

Die Bindung der letzten, α 1,2-gebundene Mannose 11 wird wieder von Alg9p katalysiert [Lehle und Sharma, unveröffentlicht] – der bislang einzige Fall im Aufbau der lipidgebundenen Oligosaccharidkette, bei dem eine Glykosyltransferase für die Bindung zweier distinkter Kohlenhydratreste verantwortlich ist. Da im natürlichen Oligosaccharidmuster, wie es bei der HPLC-Analyse des mildsauer hydrolysierten LLO-Pools des ER zutage tritt, DolPP-GlcNAc₂Man₈ die stärkste Fraktion darstellt und der nächste nachweisbare Peak das Vollängenoligosaccharid DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ ist, könnte man spekulieren, ob nicht diese Alg9p-Aktivität in einem Komplex mit den folgenden drei Glucosyltransferasen – Alg6p, Alg8p und Alg10p – auftritt. Von diesen Glucosyltransferasen weist wohl besonders die erste, Alg6p, die beobachtete Spezifität hinsichtlich der Struktur des Akzeptorsubstrats auf und stellt damit den limitierenden Schritt bei Mutanten in den DolP-Man abhängigen Mannosyltransferasereaktionen dar [13]. Dies gewährleistet, daß vorwiegend vollständig mannosyliertes Oligosaccharid glucosyliert und damit zum idealen Substrat für die OST wird. Die beiden α 1,3-Glucosyltransferasen, Alg6p und Alg8p, weisen dabei signifikante Homologie auf, wenngleich sich die beiden nicht ersetzen können. Keine Homologie existiert zwischen den Letztgenannten und der α 1,2-Glucosyltransferase Alg10p, die für den Transfer der dritten und letzten Glucose (Rest 14) verantwortlich ist.

Der *N*-Oligosaccharyltransferasekomplex (OST) aus *Saccharomyces cerevisiae*

Roland Knauer beschäftigte sich in seiner Doktorarbeit ausführlich mit dem OST-Komplex der Hefe. Ihm gelang die Reinigung eines aktiven Komplexes über Immunaффinitätschromatographie, die funktionelle Charakterisierung von Ost3p und Isolierung des *OST3*-Gens und die Entdeckung des *OST6*-Gens über die Homologie zu *OST3* sowie die Charakterisierung des zugehörigen Proteins [65, 66]. Hier möchte ich nur einen kurzen Abriß über Kernpunkte der OST geben und jüngste Veröffentlichungen mit einfließen lassen. Ausführlichere Informationen zu den einzelnen Untereinheiten sowie zum Gesamtkomplex sind den genannten Arbeiten sowie dem Review von Knauer und Lehle (1999) zu entnehmen [67].

Der OST-Komplex, in Abb. 3 schematisch skizziert, ist das Schlüsselenzym der N-Glykosylierung, indem es das über Pyrophosphat an Dolichol gebundene Oligosaccharid GlcNAc₂Man₉Glc₃ auf den Amid-Stickstoff des Asparaginrestes von Sequons des Typs Asn-Xaa-Ser/Thr überträgt.

Dabei wird hochselektiv das Vollängenoligosaccharid übertragen, gesteuert von einem komplexen Substrataktivierungsmechanismus, der anhand detaillierter kinetischer Studien von Karaoglu *et al.* [52] abgeleitet wurde. Danach besäße der Komplex eine Aktivierungsdomäne, die nach Bindung eines LLO-Moleküls (hier ist die Affinität gegenüber kürzerkettigen Intermediaten *nicht* reduziert) nachfolgend die Bindung eines weiteren LLOs sowie des Akzeptorsequons in der katalytischen Domäne befördern würde und zwar nach Art eines „Random Sequential Bireactant“-Mechanismus. Das heißt, die Bindung des zweiten LLOs kann vor oder nach der Bindung des Peptids erfolgen, wobei sich hier die Affinität des Enzyms für das eine Substrat durch die Bindung des anderen nicht zu ändern scheint. Dieser Veröffentlichung zufolge bedingt die Bindung von Vollängen-Oligosaccharidlipid in der Aktivierungsdomäne eine moderate 1.5-fache Favorisierung der Bindung des Vollängen-Substrats auch in der katalytischen Domäne. Bindet dagegen DolPP-GlcNAc₂Man₉ statt des Vollängen-LLOs in der Aktivierungsdomäne, ist die Favorisierung

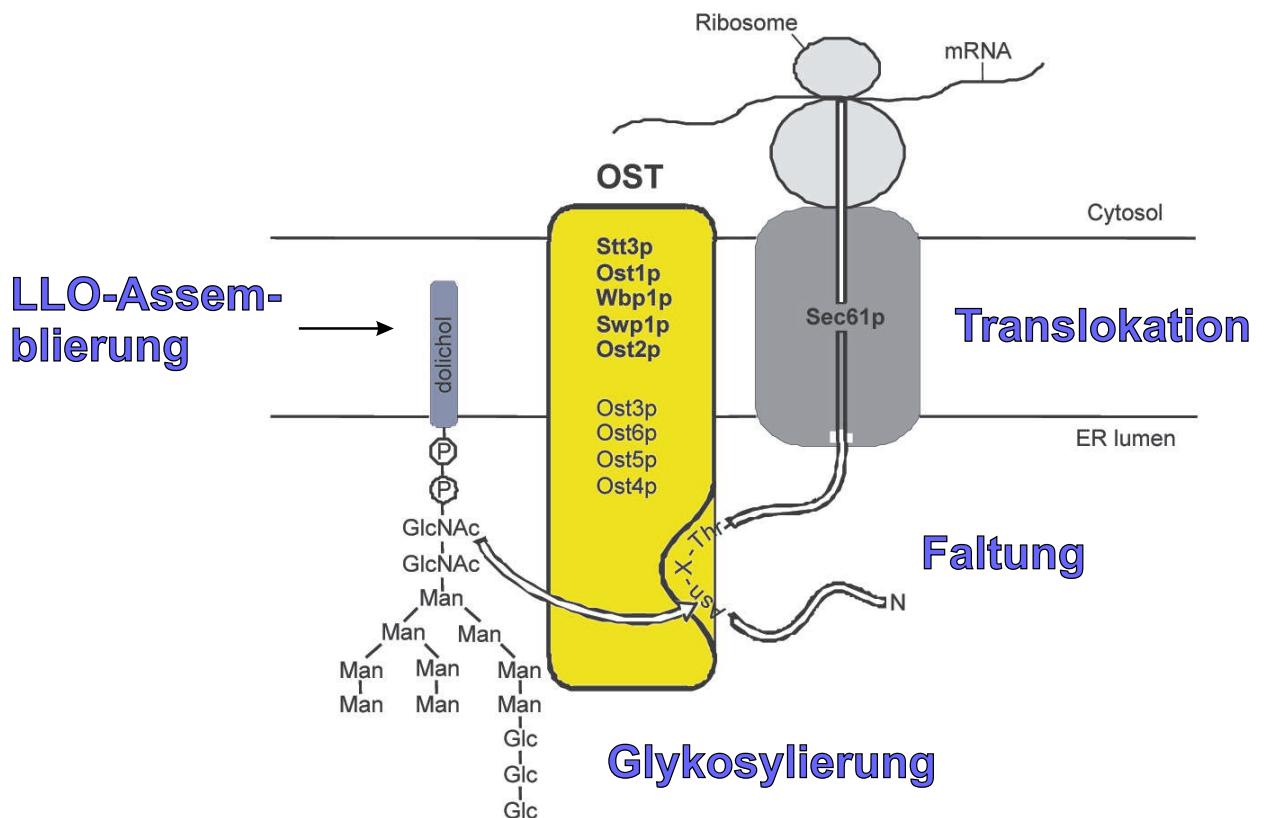


Abbildung 3: Übersicht über den Oligosaccharyltransferase-Komplex aus *S. cerevisiae*

Die OST, eingebettet in ihr Aktivitätsumfeld in der ER-Membran: Der Glykosylierung geht die LLO-Assemblierung voraus. Der luminale Transfer der Oligosaccharidkette von DolPP auf Asn-Reste des Sequons Asn-Xaa-Ser/Thr erfolgt parallel zum und eng abgestimmt mit dem Translokationsprozeß der naszierenden Polypeptidkette ins Lumen des ER. Fett gedruckt sind die essentiellen Untereinheiten. Nach Knauer und Lehle [68].

von Vollängen-LLO gegenüber DolPP-GlcNAc₂Man₉ bei der Bindung in der katalytischen Domäne *zehnfach* ausgeprägt. Da bei Mangel an Vollängen-LLO die Aktivierungsdomäne mit großer Wahrscheinlichkeit ein kürzerkettiges Intermediat binden wird, würde über den geschilderten Mechanismus noch selektiver zunächst die geringe Menge vorhandenen Vollängen-Oligosaccharids übertragen.

Selektivität bezüglich des Akzeptorsequons besteht nicht minder, ist allerdings bezüglich der optimalen Aminosäuresequenz weniger leicht zu fassen. Prinzipiell trifft die vereinfachte Charakterisierung mit Asn-Xaa-Ser/Thr zu. Dabei darf jedoch an Position X keinesfalls Prolin stehen, Prolin an Position X+2 reduziert die Glykosylierungswahrscheinlichkeit auf etwa 50 % [28]. Weiter spielt die Art der Aminosäure an Position X auch abgesehen von Prolin eine wichtige Rolle hinsichtlich der Glykosylierungswahrscheinlichkeit [107]. Außerdem weist ein Sequon mit Threonin statt Serin an dritter Stelle im Allgemeinen wesentlich höhere Glykosylierungseffizienz auf [4, 28]. Andererseits muß ein ausreichend großer Abstand des Sequons vom C-Terminus oder einer hydrophoben Stop-Transfer Sequenz existieren [89]. Zudem spielen proteinspezifische Parameter eine Rolle, so daß nie mit absoluter Sicherheit vorherzusagen ist, ob ein Sequon glykosyliert wird oder nicht.

Da die Glykosylierung kotranslational stattfindet, muß eine enge Assoziation mit dem Translokationskomplex impliziert werden.

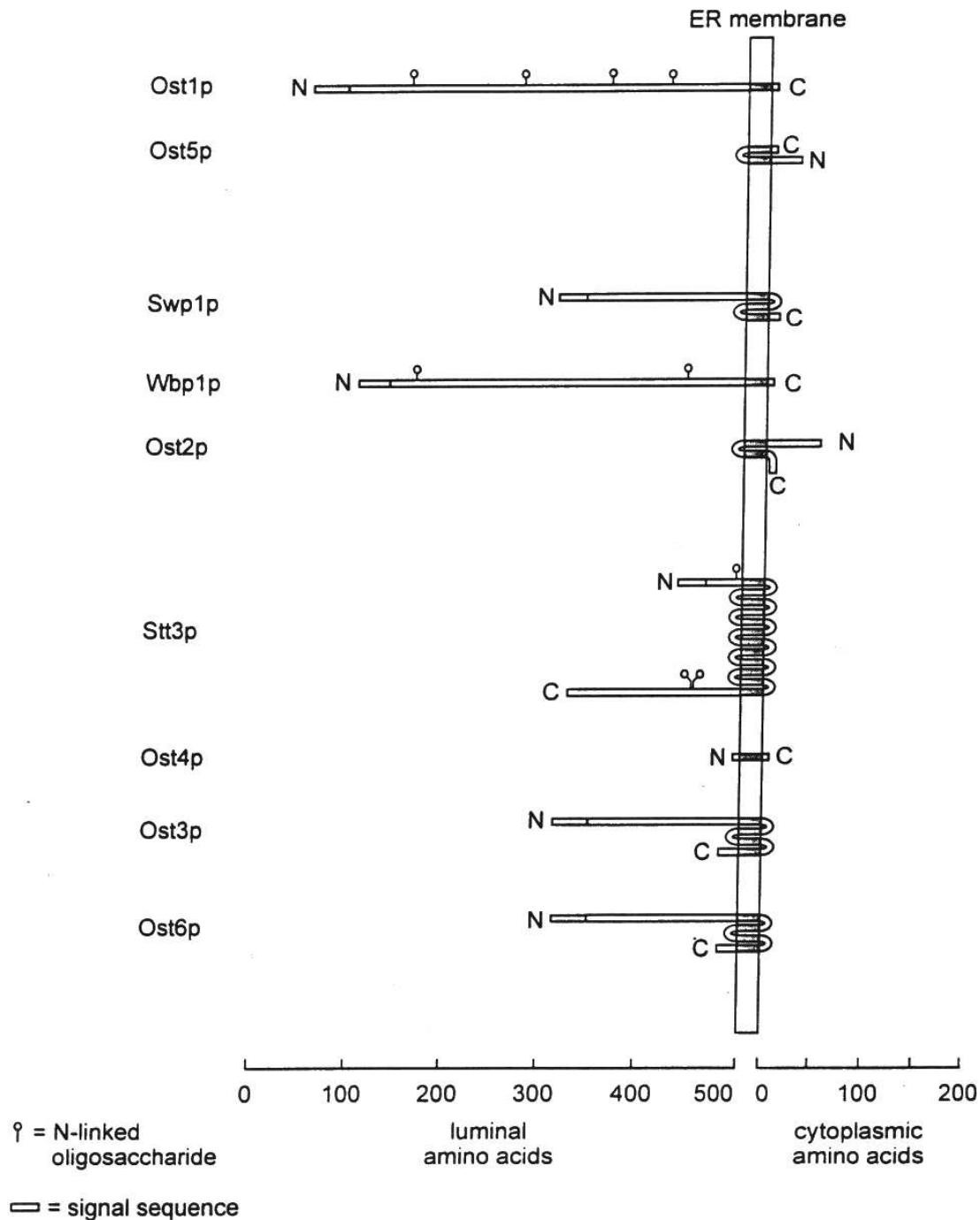


Abbildung 4: Topologie der Untereinheiten des Oligosaccharyltransferase-Komplexes aus *S. cerevisiae*

Die neun Untereinheiten des OST-Komplexes aus Hefe mit ihrer prospektiven Membrantopologie, teilweise basierend auf direkten oder indirekten experimentellen Evidenzen. Aus Knauer und Lehle [67].

Aus welchen Untereinheiten die OST aufgebaut und wie deren wahrscheinliche Membrantopologie beschaffen ist, geht aus Abb. 4 hervor. Fünf der Untereinheiten sind essentiell (fett gedruckt in Abb. 3): *OST1*, *OST2*, *STT3*, *SWP1* und *WBP1*. Zwar sind die Aufgaben der OST, wie eben kurz dargestellt, komplex. Dennoch ist bis heute unklar, wofür diese Vielzahl an Untereinheiten gebraucht wird. Daß dies keine Besonderheit der Hefe ist, geht aus Homologievergleichen hervor, die zu allen Genen der Hefeuntereinheiten auch Homologe in höheren Eukaryonten liefern [67]. Inzwischen wurde auch ein Säuger-Homolog zu *OST6* gefunden, *IAP*, und in Vorwegnahme noch unveröffentlichter Ergebnisse lassen sich Nilsson *et al.* [90] zufolge im Säugerkomplex mittlerweile homologe Proteine zu allen Hefe-Untereinheiten nachweisen, ausgenommen Ost5p.

Die stärkste Konservierung aber weist *STT3* auf – ein Homolog findet sich sogar in Archaeen (*Archaeoglobus fulgidus*), wo Protein-*N*-Glykosylierung unter Verwendung sowohl von Dolicholphosphat- als auch von Dolicholpyrophosphat-gebundenen Oligosacchariden stattfindet [8]. Da Stt3p auch eine essentielle Untereinheit des Hefeenzym darstellt, bestand schon länger der Verdacht, es könnte sich hier um die/eine katalytische Untereinheit handeln. Dies wurde jüngst durch zwei Veröffentlichungen erhärtet.

Zum einen wurde in *Campylobacter jejuni* eine Gen-Gruppe entdeckt, die offensichtlich ein Proteinglykosylierungssystem darstellt. Die funktionelle Expression des Operons in *E. coli* gelang, und die Glykosylierung war vollständig abhängig von *PGLB*, das starke Ähnlichkeit zu *STT3* aufweist [121].

Zum anderen konnten Nilsson *et al.* [90] naszierende Polypeptidketten an Stt3p photochemisch „crosslinken“. Sie arbeiteten mit „ribosome-nascent chain“-Komplexen, bei denen die verkürzten m-RNAs aufgrund des fehlenden stop-Codons am Ribosom gebunden bleiben. In unterschiedlichen Abständen vom Ribosom waren kryptische Glykosylierungssequenzen positioniert, mit Azidderivatisiertem Lys an der X-Position. Zwischen 60 und 65 Aminosäuren Abstand zum Ribosom erfolgte ein „crosslinking“ von Translokation-Komponenten (TRAM, Sec61 α), zwischen 70 und 100 AS Abstand ausschließlich zu Stt3p. Dieses „crosslinking“ war Sequenz-spezifisch und durch ein glykosylierbares Peptid hemmbar. Stt3p wäre demnach die das Sequenz-erkennende und bindende Domäne, womöglich auch die katalytische Untereinheit.

Da von den fünf essentiellen OST-Untereinheiten allein Stt3p zwölf prognostizierte Transmembranspannen hat (alle anderen ≤ 3) und dies im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Dolicholbindung stehen könnte (vergleiche die DolP-Man/DolP-Glc abhängigen Transferasen des ER), erfolgt möglicherweise auch die LLO-Bindung an Stt3p – was wiederum für Stt3p als die katalytische Domäne sprechen würde.

Neben der Herausforderung, die Stt3p-abhängigen Vorgänge weiter aufzuklären, stellt sich daher vor allem die Frage nach der Bedeutung der anderen acht Untereinheiten.

„Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) Typ I

Erst nachdem Jaeken *et al.* 1980 ein augenscheinlich neues Syndrom beschrieben hatten [44], zeichnete sich ab, daß Defekte in der Protein-*N*-Glykosylierung auch für die menschliche Gesundheit Relevanz haben können. Die molekulare Ursache allerdings konnte erst 15 Jahre später ermittelt werden: Ein Defekt in der Phosphomannomutase (PMM) [116], dem Enzym verantwortlich für die Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat.

In den folgenden Jahren wurden in immer kürzeren Abständen neue Glykosylierungsdefekte entdeckt, die ein Nomenklatur-System und eine Klassifizierung für alle diese CDG-Typen notwendig werden ließen. Gegenwärtig wird wie folgt verfahren: Liegen die Ursachen der Erkrankung in

Stoffwechselschritten, die die Synthese des lipidgebundenen Oligosaccharids oder dessen Transfer auf Proteine berühren, handelt es sich um CDG Typ I. Sind die nachfolgenden Prozessierungsschritte der *N*-gebundenen Oligosaccharidketten betroffen, liegt Typ II vor. Die weitere Untergliederung von CDG I und II erfolgt chronologisch, abhängig vom Zeitpunkt der ersten Veröffentlichung in Form kleiner Buchstaben – so CDG-Ia für den zuerst entdeckten Defekt in der Phosphomannomutase.

Das klinische Bild, das zum ersten Verdacht auf einen CDG-Fall führen kann, ist sehr komplex, da multisystemisch und variabel – weshalb auch sicher noch viele Fälle unentdeckt sind [26, 27]. Die verbreitetsten Pathologien während der Entwicklung und frühen Kindheit – in der Glykoproteine von besonders hoher Relevanz sind – umfassen die psychomotorische Entwicklung und damit häufig geistige Retardation, desweiteren Hypotonia, Leberdysfunktionen, Koagulopathie, Magen-Darm-Probleme, Anfälle und häufig beeinträchtigtes Sehvermögen.

Die biochemische Diagnose erfolgt dabei vor allem über Serum-Transferrin als „Marker“-Protein. Es trägt im Normalfall zwei biantennäre, *N*-gebundene Oligosaccharidketten, wobei jede „Antenne“ mit einem Sialinsäurerest modifiziert ist. Dies führt in der Summe zu vier negativen Ladungen, die den Isoelektrischen Punkt beeinflussen. Im Falle von CDG-Typ I führt dann entweder der unzureichende Umfang lipidgebundener Oligosaccharide oder unzureichender Transfer durch die OST zum Ausfall einer oder beider Oligosaccharidreste des Transferrins und damit zum Verlust von zwei oder vier der vorhandenen Ladungen. Dies hat eine Änderung des Isoelektrischen Punktes zur Folge, der über isoelektrische Fokussierung detektiert werden kann. Um neben der Ladung auch eine veränderte Kettenlänge oder Struktur, wie sie vor allem bei CDG-Typ II zu erwarten wäre, auflösen zu können, bedient man sich zusätzlich noch der Gelelektrophorese in Agarose bzw. SDS-PAGE [26]. Erhärtet sich derart beispielsweise ein CDG Typ-I Verdacht, erfolgt die biochemische Analyse von Metaboliten, insbesondere des LLO-Pools. Findet man dort eine Anreicherung oder Abreicherung einer Zwischenstufe, ist dies ein erster Indikator für einen enzymatischen Defekt. Dabei werden gewöhnlich Fibroblasten *in vivo* mit [2-³H]Mannose markiert, um so Glykosylierungseffizienz, Struktur der lipidgebundenen sowie proteingebundenen Oligosaccharidketten wie auch der Mengen von Metaboliten wie Man-1-P oder GDP-Man untersuchen zu können. Kristallisiert sich derart ein Verdacht auf einen spezifischen Enzymdefekt heraus, kann häufig über Homologie-Suche, ausgehend von bekannten Hefe-Genen, auf die humane Sequenz geschlossen und diese sequenziert werden. Ein potentieller Gendefekt kann einerseits über spezifische *in vitro*-Enzymtests biochemisch validiert werden, andererseits über Komplementationstuden in entsprechenden Hefe- oder „Chinese hamster ovary cells“-Mutanten.

Bislang bekannte CDG-I Subtypen sind mit ihrer Stellung im biochemischen Syntheseweg eingezeichnet in Abb. 1. Alle bislang entdeckten Defekte sind autosomal rezessiv. Zudem scheint immer eine Restaktivität der betroffenen Enzyme lebensnotwendig zu sein – ein Totalausfall ist für Typ I nicht bekannt.

Im Bild unten sind die beiden zuerst entdeckten Subtypen Ia und Ib schematisch eingezeichnet. Der Defekt in der Phosphomannomutase (PMM), aufgeklärt 1995 [70, 116] ist bislang bei etwa 300 Patienten die mit Abstand häufigste Ursache des CDG-Syndroms. PMM wandelt Man-6P in Man-1P um, das wiederum für die Synthese von GDP-Man benötigt und damit über DolP-Man auch für die GPI-Ankersynthese gebraucht wird. Entsprechend vielfältig ist das klinische Bild, zudem im Schweregrad stark von der Art der Mutation abhängig [26, 27].

1998 erfolgte die Aufklärung des CDG Ib-Subtyps – nahezu gleichzeitig durch drei unterschiedliche Arbeitsgruppen [17, 18, 45, 88]. Hier liegt die Ursache in der Phosphomannose Isomerase, die Fructose-6P in Mannose-6P umwandelt. Zwei Besonderheiten zeichnen diesen Subtyp aus. Einmal ist er der einzige ohne geistige Retardation, Neuropathie oder Ataxie. Und zum anderen der einzig bislang therapierbare Subtyp – durch orale Mannose-Supplementation. Mit etwa 20 Patienten ist dies die bislang dritthäufigste Ursache für CDG Typ I.

CDG-Ic, die Defizienz im humanen Ortholog zum Hefe *ALG6*, der ersten Glucosyltransferase, wurde erstmals 1998 unter Beteiligung unserer Arbeitsgruppe beschrieben [69] und ist mit etwa 30 Patienten der zweithäufigste Subtyp [26]. Klinisch besteht Ähnlichkeit zum Typ Ia. Biochemisch sind Transferrin-Formen zu beobachten, denen eine oder beide der *N*-gebundenen Oligosaccharidketten fehlen, bedingt durch die stark eingeschränkte Verfügbarkeit glucosylierten Vollängen-LLOs, der einzigen durch OST übertragenen Spezies. Das im Patienten akkumulierte DolPP-GlcNAc₂Man₉ fungiert hier demnach nicht als OST-Substrat.

Auch CDG-Id war unter Mitwirkung unserer Arbeitsgruppe beschrieben worden (1999) [71]. Hier handelt es sich um einen Defekt im humanen Ortholog zum Hefe *ALG3*, der ersten DolP-Man abhängigen Mannosyltransferase. Wie bei CDG-Ic tritt Serumtransferrin mit nur einer Oligosaccharidkette auf. Fibroblasten des Patienten akkumulieren DolPP-GlcNAc₂Man₅, das, neben einem geringeren Teil Vollängenoligosaccharids, auch auf Protein übertragen wird. Allerdings allem Anschein nach in glucosylierter Form, da die Oligosaccharidketten neusynthetisierter Glykoproteine noch etwa zur Hälfte aus GlcNAc₂Man₅Glc₁ bestanden – analog zu Kontrollfibroblasten mit etwa 50 % monoglucosyliertem Vollängensaccharid. Dies stimmt gut mit der oben zitierten Veröffentlichung von Chapman [10] überein und unterscheidet das menschliche System von der Hefe, wo praktisch fast ausschließlich unglucosyliertes GlcNAc₂Man₅ proteingebunden zu finden war.

CDG-Ie stellt einen Defekt im humanen Homolog zur Hefe Dolicholphosphat-Mannose Synthese dar [39, 62]. Auch hier leistete Hefe einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung, wenngleich die Enzymaktivität in Säugern von einem Komplex dreier Proteine konstituiert wird, nämlich Dpm1p, Dpm2p und Dpm3p. Dpm1p_{hum} entbehrt dabei sowohl eine Transmembrandomäne als auch ein ER-Retentionssignal und bedarf daher der Interaktion mit den beiden anderen Untereinheiten. Dennoch kann das Hefe-Gen Säugerzelllinien mit Defekt in der DolP-Man Synthese komplementieren. CDG-If (2001) fehlt in Abb. 1, da ein dem hier betroffenen menschlichen Gen entsprechendes Hefe-Gen bislang nicht gefunden wurde oder nicht existiert. Es handelt sich um einen Defekt in *MPDU1* [72, 103], dem Gen für ein Protein, das bei allen Säugern in einer noch nicht näher geklärten Art und Weise DolP-Man und DolP-Glc für die diese Glykosyldonoren nutzenden Glykosyltransferasen verfügbar macht [2].

CDG-Ig (2002) wurde enzymatisch in der vorliegenden Arbeit analysiert und konnte in Zusammenarbeit mit der Gruppe Körner/Figura aus Göttingen als Defekt im humanen Ortholog zum Hefe Alg12p beschrieben werden [113]. Dies katalysiert den α 1,6-Mannosyltransfer auf DolPP-GlcNAc₂Man₇ und ist damit eines der Enzyme, die kritisch für die Bildung von Verzweigungen sind. Die Analyse von Serumtransferrin zeigte den teilweisen Verlust von einer bis zwei der proteingebundenen Oligosaccharidketten. Im LLO-Pool war DolPP-GlcNAc₂Man₇ stark angereichert, und auch die von neusynthetisierten Proteinen stammenden Oligosaccharide waren überwiegend mit GlcNAc₂Man₇ modifiziert. Auch hier war wie bei CDG-Id ein dem monoglucosylierten Vollängenoligosaccharid in der humanen Kontrolle entsprechender Anteil monoglucosyliert, was den Transfer von GlcNAc₂Man₇Glc₃ durch die OST sehr wahrscheinlich macht – in Übereinstimmung mit den entsprechenden Daten aus den Hefemutanten *alg9* sowie *alg12* (siehe oben).

Der jüngste, ebenfalls im Rahmen dieser Dissertation behandelte CDG-Subtyp Ii (2003) [114] ist der erste Fall, in dem ein Defekt im cytoplasmatisch ablaufenden Teil der Lipidoligosaccharid-

synthese auftritt. Der Defekt liegt im humanen Ortholog zum Hefe *ALG2*, dessen bisher unklare Funktion erst im Laufe der vorliegenden Analyse als Gen der α 1,3-Mannosyltransferase geklärt werden konnte.

Wie aus der Zusammenfassung der bislang bekannten CDG TypI-Fälle hervorgeht, ist bislang noch kein Defekt in der Oligosaccharyltransferase selbst bekannt. Zwar dürfte ein ernster Defekt letal sein, Fälle mit reduzierter Transferaseaktivität wären aber durchaus zu erwarten. Aufgrund des Aufbaus aus acht bis neun verschiedenen Untereinheiten ist allerdings die genetische Analyse mit Schwierigkeiten behaftet.

Zielsetzung der Arbeit

Hefe als Modellorganismus für das Verständnis der *N*-Glykosylierung

Der OST-Komplex aus *S. cerevisiae* sollte in Fortsetzung der Arbeiten von R. Knauer bezüglich der nichtessentiellen homologen Untereinheiten Ost3p und Ost6p weiter untersucht werden. Bei Analyse unterschiedlicher Glykoproteine hatte die Disruption beider Proteine einen additiven Unterglykosylierungs-Phänotyp zur Folge, andererseits konnte die Überexpression von *OST6* den Glykosylierungsdefekt in Δ *ost3* komplementieren. Von den Einzeldisruptanten zeigte allerdings nur Δ *ost3* deutliche Unterglykosylierung, Δ *ost6* dagegen nur sehr schwach ausgeprägt [66]. Dies sprach für eine partielle Redundanz der beiden Untereinheiten.

Dagegen hatte sich in Wachstumstests bereits eine besondere Bedeutung von Ost6p für die Resistenz gegenüber Zellwandstress angedeutet [65]. Dem sollte, unter Verwendung neuer Kombinationen von Deletionsmutanten mit Expressionsplasmiden, nachgegangen werden.

Ferner war aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Untereinheiten Ost3p und Ost6p die Frage zu beantworten, ob eine gegenseitige Verdrängung aus dem Komplex möglich wäre. Auch war unklar, ob es zwei unterschiedliche OST-Komplexe gibt, deren einer Ost3p, deren anderer Ost6p enthielte, oder aber einen Komplex mit beiden Untereinheiten.

Die GlcNAc-Transferase (GNT) aus *S. cerevisiae* stellte noch immer eine der wenigen, genetisch nicht identifizierten Glykosyltransferasen der lipidgebundenen Oligosaccharidsynthese dar. Fernziel war die affinitätschromatographische Reinigung dieses Enzyms, um über Edmann-Abbau oder Massenspektroskopie zumindest teilweise der Aminosäuresequenz und schließlich des zugehörigen Gens habhaft zu werden. Dazu war zunächst eine geeignete Solubilisierungsmethode zur Extraktion aus Membranen zu entwickeln, um ein Solubilisat ausreichender Aktivität und Stabilität zu erhalten. Mit diesem Extrakt sollte dann eine Charakterisierung des Enzyms erfolgen.

Protein-*N*-Glykosylierung und humane Erbkrankheiten (CDG)

Die Hefe als Instrument zur Analyse humaner Glykosylierungsdefekte sollte einerseits eingesetzt werden, um die zur biochemischen Untersuchung humaner Zellen nötigen lipidgebundenen Oligosaccharidsubstrate zu synthetisieren. Eine bereits vorhandene *in vitro*-Methode zur Herstellung von DolPP-GlcNAc₂ sollte optimiert und darüber hinaus *in vitro*-Verfahren zur Gewinnung weiterer kurzkettiger dolicholgebundener Oligosaccharidsubstrate entwickelt werden.

Außerdem sollten Hefe *alg*-Mutanten („asparagine linked glycosylation“) mit ihren gut charakterisierten Defekten dazu dienen, über Komplementationsanalysen zur Abklärung prospektiver humaner Gendefekte (CDG) beizutragen.

Die biochemische Analyse von CDG-Fällen sollte ein Schwerpunkt der Arbeit sein. Dazu war zunächst die Etablierung von Zellkulturverfahren für Fibroblasten und Lymphoblasten erforderlich, um das nötige Zellmaterial gewinnen zu können. Damit sollten *in vitro*-Testverfahren für die am Aufbau der lipidgebundenen Oligosaccharidkette beteiligten Glykosyltransferasen sowie der OST entwickelt bzw. weiterentwickelt werden. Schließlich war die Anwendung dieser Verfahren zur enzymatischen Charakterisierung von Zellmaterial aus CDG-Patienten das Ziel.

Ergebnisse und Diskussion

Kapitel I

Experimente zum *N*-Oligosaccharyltransferase-Komplex aus *S. cerevisiae*

I.1 Untersuchungen zur Zusammensetzung des OST-Komplexes im Hinblick auf die Untereinheiten Ost3 und Ost6

I.1.1 Der Wachstumsphänotyp einer *OST6*-Disruption bezüglich Temperatur sowie Coffein bleibt unbeeinflusst von einer *OST3*-Überexpression

Ost3 und Ost6 sind Untereinheiten der Oligosaccharyltransferase, die zwar nur moderate Sequenzidentität (20 %), jedoch auf Proteinebene eine erstaunlich ähnliche Membrantopologie aufweisen [66]. Wie bereits aus vorangegangenen Arbeiten zur Rolle von Ost3p bzw. Ost6p hervorging, scheinen sich beide Komponenten hinsichtlich ihrer Funktion allerdings nur partiell zu überlappen [65, 66].

In der Arbeit von Knauer und Lehle (1999) [66] wurden verschiedene N-glykosylierte Proteine der Hefe hinsichtlich ihrer Glykosylierung im WT, der *ost3*-, der *ost6*- bzw. der Doppeldisruptante $\Delta ost3 \Delta ost6$ untersucht. Diese Proteine zeigen wenig oder fast keine Unterglykosylierung im Falle der *ost6*-Disruptante, deutliche für die *ost3*-Disruption und drastische Unterglykosylierung für die Doppeldisruptante $\Delta ost3 \Delta ost6$. Bei den hier untersuchten Glykoproteinen also scheint Ost3p die für die Glykosylierung relevantere Untereinheit zu sein. Die jeweils drastischere Unterglykosylierung bei zusätzlichem Fehlen von Ost6p bzw. die mögliche Komplementation des Glykosylierungsdefekts von $\Delta ost3$ durch Überexpression von *OST6* weist jedoch auf eine gewisse funktionelle Redundanz beider Untereinheiten hin.

Etwas anders stellt sich dies im Falle von Wachstumstests dar. Knauer zeigte bereits 1997 [65] einen ts-Phänotyp für die *ost6*-Disruptante, der durch osmotische Stabilisierung mittels 1 M Sorbit kompensiert werden konnte. Offensichtlich handelt es sich also um eine temperaturabhängige Osmolabilität, was stark für eine Zellwandlabilität spricht (siehe unten). $\Delta ost3$ dagegen verhielt sich hier wie der Wildtyp. In der gleichen Arbeit sowie in [66] wurde das Wachstumsverhalten bezüglich der Zellwandstressoren Calcofluor white und Coffein untersucht. Hinsichtlich beider Stoffe in ähnlich drastischer Ausprägung wies wiederum ausschließlich die *ost6*-Disruptante einen Wachstumsphänotyp auf, $\Delta ost3$ zeigte im Wesentlichen normales Wachstum. Damit im Einklang wuchs die $\Delta ost3 \Delta ost6$ -Doppeldisruptante nicht schlechter als die *ost6*-Einfachdisruptante, was auf eine

besondere Bedeutung von Ost6p für die Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität unter Stressbedingungen hinweist.

Um diesem Phänomen etwas weiter auf den Grund zu gehen, wurden folgende Hefestämme einem Wachstumstest bei 37°C bzw. 30°C und 7.5 mM Coffein unterzogen: SS328 (haploider Wildtyp), $\Delta ost3$, $\Delta ost6$, $\Delta ost3 \Delta ost6$, $\Delta ost3$ + pOST3 (Einfachdisruptante transformiert mit Multicopyvektor *OST3*), $\Delta ost3 \Delta ost6$ + pOST3 (Doppeldisruptante transformiert mit Multicopyvektor *OST3*), $\Delta ost3 \Delta ost6$ + pOST6 (Doppeldisruptante transformiert mit Multicopyvektor *OST6*).

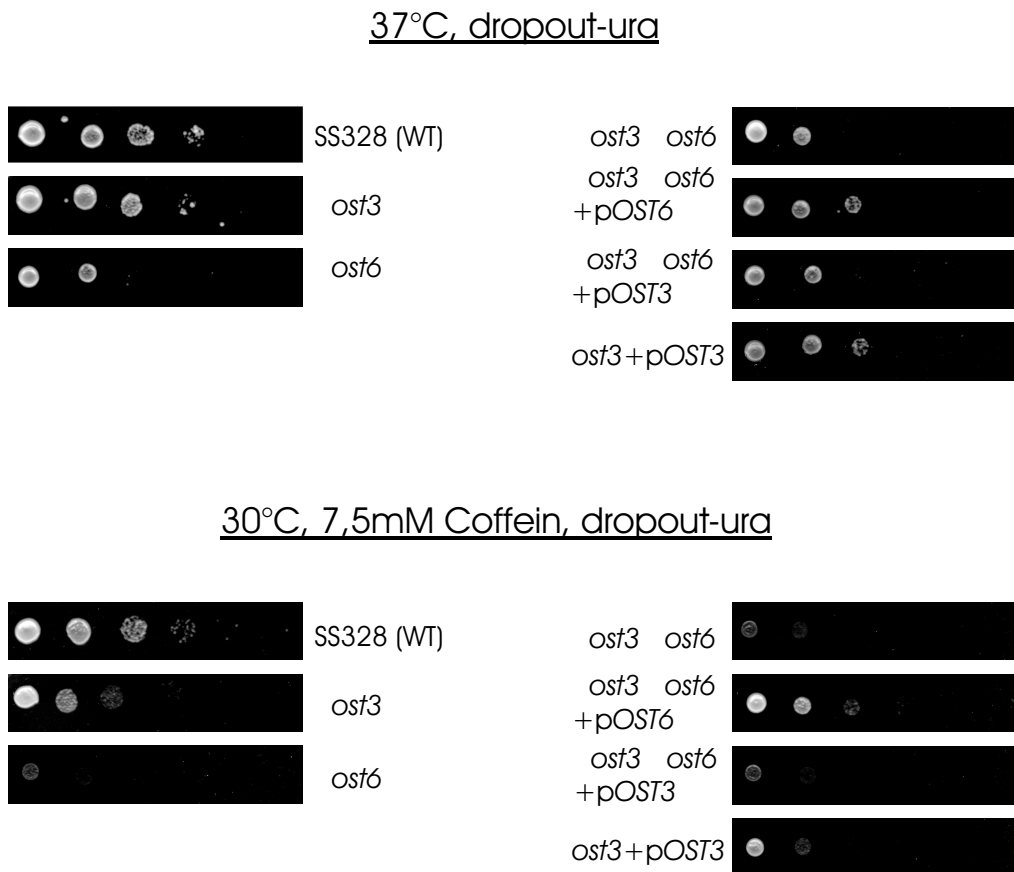


Abbildung I.1: Wachstumstest in Abhängigkeit von Temperatur und Coffein

Auf Platten mit Selektivmedium „dropout-ura“ wurde das Wachstumsverhalten der jeweiligen Stämme in Verdünnungsschritten von je einer Zehnerpotenz, von 10^7 bis 10^2 Zellen/ml, untersucht: Bei 37°C zum Test auf ts-Phänotyp bzw. bei 30°C und 7.5 mM Coffein zum Test auf Defekte im „cell wall integrity pathway“. Je Verdünnungsstufe wurden 3 μ l aufgetragen.

Wie aus Abb. I.1 hervorgeht, weist bei 37°C sowohl $\Delta ost6$ als auch die Doppeldisruptante $\Delta ost3 \Delta ost6$ ein wesentlich schlechteres Wachstum auf als der WT bzw. $\Delta ost3$. Eine Überexpression von *OST6* in $\Delta ost3 \Delta ost6$ zeigt, anders als die ohne Wirkung bleibende Überexpression von *OST3*, ein um eine Verdünnungsstufe besseres Wachstum und entspricht damit erwartungsgemäß in etwa der *ost3*-Einfachdisruptante.

Ein ganz ähnliches, nur drastischeres Bild, ergibt sich auf Coffein-Platten. $\Delta ost3$ weist ein, verglichen mit dem WT, moderat reduziertes Wachstum auf, wogegen $\Delta ost6$ nahezu kein Wachstum

mehr zeigt - vergleichbar mit der Doppeldisruptante. Auch hier, bei Coffein als Stressor, vermag nur die Überexpression von *OST6* in $\Delta ost3 \Delta ost6$ eine Wachstumsverbesserung auf $\Delta ost3$ -Niveau zu bewirken, die Überexpression von *OST3* bleibt völlig wirkungslos.

Mehr noch überrascht der Phänotyp von $\Delta ost3 + pOST3$, und zwar bei 37°C wiewohl auch auf Coffein: Ein nativer Level von Ost6p zusammen mit dem auf Plasmid überexprimierten Ost3p sollte zu einem Wildtyp-ähnlichen Wachstum führen. Da aber stattdessen ein Wachstumsphänotyp irgendwo zwischen $\Delta ost3$ und $\Delta ost6$ zu beobachten ist, scheint folgende Hypothese einer Erwägung wert: Könnte das im Überschuß vorhandene Ost3p, „nutzlos“ hinsichtlich der hier angewandten Stressoren, jedoch Ost6p in Größe und Struktur sehr ähnlich, letzteres - da in weitaus geringerer Menge vorhanden - aus dem OST-Komplex weitgehend verdrängt, mithin inaktiviert haben? Ich möchte darauf später noch zurückkommen.

Diese Experimente bestätigen die bereits oben geäußerte Vermutung, Ost6p könnte - ganz im Gegensatz zu Ost3p - eine besondere Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität unter Stressbedingungen haben. Selbst eine Überexpression von Ost3p in der Doppeldisruptante $ost3\Delta ost6\Delta$ bleibt hinsichtlich Zellwandstressoren absolut wirkungslos. Es scheint eine starke Spezialisierung von Ost6p hinsichtlich dieser physiologischen Anforderungen zu bestehen; die oben für enzymatische Glykoproteine geschilderte augenscheinliche Redundanz im Wirkungsspektrum beider Untereinheiten ist hier zu vernachlässigen.

Wie kann man sich die Wirkung von Ost6p hinsichtlich der Zellintegrität vorstellen? Welche Aussagen lassen sich anhand des Wachstumsverhaltens bezüglich der eingesetzten Stressoren im einzelnen ableiten?

Dazu ist es unerlässlich, die Angriffspunkte der einzelnen Stressoren zu verstehen. Folgendes ist bekannt:

Der anionische Farbstoff Calcofluor white bindet vorwiegend an β 1,4-Glukane, das heißt auf Hefe bezogen an Chitin [95, 124], und interferiert durch seine Bindung mit dessen Polymerisation [22]. Chitin spielt eine wichtige Rolle für die stabile, unlösliche Vernetzung der verschiedenen Zellwand-Module untereinander. Es bindet an die nicht reduzierenden Verzweigungen sowohl des β 1,3- als auch des β 1,6-Glukans. Zur Koppelung unterschiedlicher Zellwandmodule kommt es dann durch die antiparallele Zusammenlagerung mehrerer linearer Chitin-Ketten über H-Brücken zu äußerst stabilem kristallinem α -Chitin [63, 83]. Dies erklärt die starke kompensatorische Steigerung des Zellwandchitingehalts in Zellen mit Bildungsdefekten von Zellwandkomponenten auf bis zu 20 % des Wandtrockengewichts bei nur 1-2 % im WT. Indem nun Calcofluor white die Chitinpolymerisation und damit im Weiteren die Komponentenvernetzung stört, sind Zellwandmutanten durch diesen Stoff besonders verwundbar. Es kommt unmittelbar zur Zellwanddestabilisierung und damit zu Zellwandstress.

Temperaturstress durch Temperaturen zwischen 37 und 39°C führt höchstwahrscheinlich über eine schnelle, innerhalb von Minuten einsetzende und bis zu 90 Minuten andauernde Konzentrationszunahme von sowohl Trehalose (bis zu 0.5 M) also auch Glycerin zu einem entsprechenden Anstieg des Turgors und damit einer zunehmenden Belastung der Zellwand [63]. Auch hier kommt es unmittelbar zu Zellwandstress, allerdings nicht durch die Destabilisierung der Zellwand, wie oben geschildert, sondern durch deren Mehrbelastung. Zellen mit Defekten, die sich auf die Zellwandstabilität auswirken, sind damit von Temperaturstress besonders betroffen.

Anders liegt der Fall wohl bei Coffein: Sehr sicher erfolgt die Wirkung nicht an der Zellwand

selbst, sondern über intrazelluläre Mechanismen. So kann der Coffein-Phänotyp in Zellen, in denen die MAP-Kinase (Mitogen Activated Protein) des „cell wall integrity pathways“ (Pkc1-MAP-Kinaseweg) deletiert wurde (*slt2Δ*) durch Überexpression von *SNQ2*, einem Multidrug-Exporter, supprimiert werden [86]. Die Wirkung beruht wohl auf zwei unterschiedlichen Mechanismen: Einerseits hemmt Coffein die Phosphodiesterasen Pde1/2, verantwortlich für die Hydrolyse von cAMP. Dies hat einen erhöhten cAMP-Spiegel zur Folge, was zu *pde2Δ* ähnlichen zellphysiologischen Erscheinungen führen dürfte: Der Aktivierung des Ras/cAMP-abhängigen Protein Kinase A-Wegs, der die Expression von Genen mit „stress response elements“ (STREs) negativ reguliert und zu einer Zellwanddestabilisierung führt. Entsprechend hat die Überexpression von *PDE2* die Hemmung des PKA-Wegs und damit Zellwandstabilisierung sogar in sonst osmosensitiven Mutanten zur Folge. Möglicherweise wirkt der Pkc1/MAP-Kinaseweg antagonistisch zum cAMP/PKA-Weg [63].

Allerdings ist dies sicher nicht der einzige Wirkmechanismus [86]. Vielmehr spielt womöglich auch eine Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung von Coffein eine Rolle, die zumindest für Säugerzellen gezeigt werden konnte [9, 43]. Calcium wiederum beeinflusst die Zellwandsynthese sowohl über die Actin-abhängige Morphogenese via Cdc24 als auch über die polarisierte Sekretion via Calmodulin, die ja zum zielgerechten „Targeting“ von Wandkomponenten essentiell ist. Und zum dritten reguliert es die Glukan-Synthese via Calcineurin. Mutanten bezüglich der Zellwandintegrität sind denn auch häufig besonders sensitiv gegenüber Ca^{2+} , ohne dabei aber hypersensitiv gegenüber allgemein hoher Salinität zu sein [16].

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß Coffein, anders als die oben genannten Stressoren, weder direkt an der Zellwand angreift und sie damit destabilisiert, noch zu einer vermehrten Wandbelastung etwa durch gesteigerten Turgor führt. Vielmehr erfolgt eine Störung der zellulären Signaltransduktion, die in WT-Zellen durch einen funktionierenden Pkc1/MAP-Kinaseweg weitgehend kompensiert werden kann. Screening mit Coffein führt damit weitaus selektiver zur Detektion von Mutanten, in denen der „cell wall integrity pathway“ betroffen ist. Denn anders als bei einem Defekt in der Signaltransduktion, der sowohl durch Coffein als auch durch CFW oder Temperaturstress zu detektieren wäre, wäre bei einem Defekt in der Zellwandsynthese bei funktionierendem Pkc1/MAP-Kinaseweg kein ausgeprägter Coffein-Phänotyp zu erwarten: Coffein führt schließlich zu keinem vermehrten äußeren Stress. Daher kann bei einem intakten Pkc1/MAP-Kinaseweg den von Coffein verursachten Störungen in der Zellwandphysiologie erfolgreich entgegengewirkt werden.

Δost6 jedoch ist sensitiv gegenüber CFW, Temperaturstress und Coffein, was für Auswirkungen dieser Deletion auf Faktoren in der Signaltransduktion und gegen Störungen in der eigentlichen Zellwandsynthese spricht.

Wie also ist ein Zusammenhang zwischen Zellwandintegrität und N-Glykosylierung vorstellbar? Zwar ist klar, daß das Ausmaß N-gebundener Glyko-Ketten von kovalent an das Glukan-Netzwerk gebundenen Zellwandglykoproteinen (Mannoproteinen) ganz wesentlich zur Undurchlässigkeit und Stabilität der Zellwand beiträgt [19]. Auch spricht viel dafür, daß die OST-Aktivität Pkc1p-abhängig von einer „Basalaktivität“ von etwa 50 % in *pkc1Δ* oder in mit Staurosporin, einem spezifischen Inhibitor von Pkc1p, behandelten WT-Zellen auf die in WT-Zellen ohne Staurosporin gemessenen 100 % Aktivität gesteigert wird (in vitro-Aktivitäten) [92]. Doch all dies betrifft die *Quantität* der N-Glykosylierung. Da gerade in *ost6Δ* diese Quantität sowohl *in vivo* (10 bis max. 19 % Unterglykosylierung bzgl. WT bei Invertase, CPY, Proteinase A, DPAP B wie auch Wbp1p, einer Untereinheit der OST) als auch *in vitro* (95 % WT-Aktivität hinsichtlich des Vollängen-

Donorglykolipids) gering und deutlich weniger betroffen ist als bei *ost3Δ* [65], könnte die Ursache also in der *Qualität*, das heißt hinsichtlich Glykosylierungsstörungen in wenigen, aber entscheidenden Proteinen zu suchen sein. Die Untereinheit Ost6p könnte demnach Ausdruck einer Spezialisierung für ganz bestimmte, in irgendeiner Weise in die Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität involvierte Glykoproteine sein. Dies um so mehr, als die weiter unten gezeigten Ergebnisse für einen eigenen OST6-Komplex sprechen, der hinter dem OST3-Komplex mengenmäßig deutlich zurücksteht (vgl. I.1.2).

Der aufgrund des spezifischen Coffein-Phänotyps naheliegende Gedanke, N-glykosylierte Rezeptorproteine des für *S. cerevisiae* zur Aufrechterhaltung einer intakten Zellwand essentiellen „cell wall integrity pathway“ [31] in der Cytoplasmamembran könnten betroffen sein, bestätigte sich zumindest für Mid2p nicht. Dieses Typ 1 Membranprotein, dessen periplasmatische Domäne durch ausgeprägte O-Mannosylierung wohl versteift [60] und darüber hinaus durch eine N-glykosidische Kette modifiziert ist, erwies sich als einer der Rezeptoren des Pkc1/MAP-Kinasewegs [94]. Dabei ist sowohl die O-Mannosylierung der periplasmatischen Domäne [94] als auch deren N-glykosidische Modifikation essentiell für die Funktion von Mid2p (Dr. Sabine Strahl, persönliche Mitteilung). Sollte nun Ost6p auf stark O-mannosylierte Proteine dieser Art „spezialisiert“ sein, wäre eine ausgeprägte Unterglykosylierung bezüglich der N-glykosidischen Modifikation in *ost6Δ* zu erwarten. Stattdessen war der Glykosylierungsdefekt übereinstimmend mit den oben erwähnten Ergebnissen von Knauer *et al.* [66] in *ost6Δ* eher schwächer ausgeprägt als in *ost3Δ* und nur in der Doppeldisruptante *ost3Δ ost6Δ* besonders deutlich.

Weitere Kandidaten, die alle sowohl stark O-, als auch N-glykosyliert sind oder sein könnten (unter Berücksichtigung der in [4, 28, 89, 107] benannten Parameter) und periplasmatisch sehr wahrscheinlich am Umbau oder der Vernetzung von Zellwandkomponenten beteiligt sind, kämen als „Ost6p-spezifisch“ in Frage, ohne aber speziell die Coffein-Sensitivität erklären zu können. Zunächst ist das GPI-Zellwandprotein Gas1 zu nennen, eine Endotransglykosylase, nachweislich sowohl N- als auch O-glykosyliert [16, 63]. Desweiteren Crh1p und Crh2p (23.8 % Identität), beide wahrscheinlich sowohl O- (Polyserin-Bereiche) als auch N-glykosyliert (3 bzw. 5-6 Sequons) und GPI-Zellwandproteine [97]. Entsprechende Untersuchungen über die N-Glykosylierung dieser Proteine in *ost6Δ* wurden jedoch noch nicht durchgeführt.

Letztlich bleibt also offen, worin die spezielle Funktion des Ost6p und damit des OST6-Komplexes (siehe I.1.2) liegt. Bemerkenswert jedenfalls erscheint die im Gegensatz zu Ost3p gegebene spezielle Bedeutung für die Zellwandintegrität der Hefe.

In der Säuger-OST [58] wurden inzwischen zwei Stt3p-Homologe gefunden, bezeichnet als Stt3-A und Stt3-B, die unterschiedliche OST-Komplexe zu konstituieren scheinen. Stt3-B ist entwickungsgeschichtlich älter und entspricht dem Hefe-Stt3-Protein. Der Stt3-B-Komplex weist eine höhere V_{max} auf und überträgt unvollständig prozessierte LLO-Intermediate mit größerer Effektivität. Dagegen sinkt für den Stt3-A-Komplex bei LLO-Man₉ gegenüber LLO-Man₉Glc₃ V_{max} und der K_p -Wert für die Peptidbindung ist erhöht. mRNA-Expressionsstudien legen zudem nahe, der Stt3-A-Komplex könnte vorwiegend IAP, homolog zum *S. cerevisiae* Ost6p, der Stt3-B-Komplex dagegen N33-1 enthalten, homolog zum Ost3p aus Hefe. Dabei war die Expression von Stt3-A besonders hoch in Geweben bzw. Zelllinien mit hoher Sekretionsrate. Könnte hier die Versorgung mit Vollängen-LLO eher limitierend werden und damit eine erhöhte Selektivität hinsichtlich des Vollängen-LLO's von größerer Bedeutung sein? Wäre Ähnliches auch für den Hefe-OST6-Komplex möglich? Da es hier allerdings nur *ein* Stt3p gibt, könnten die beiden OST-Komplexe, OST3- und OST6-Komplex, auch Ausdruck einer völlig anderen Spezialisierung sein. Auch war

in kinetischen Untersuchungen zur Hefe-OST eine weniger stark ausgeprägte Änderung des K_p in Abhängigkeit vom LLO-Substrat festzustellen (1.5-fach höher bei DolPP-GlcNAc₂Man₉ versus DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃) [52].

I.1.2 Ost3p und Ost6p – strukturell ähnliche Untereinheiten der OST: Untersuchungen zu möglichen Auswirkungen von deren Überexpression bzw. Deletion auf die Zusammensetzung des Komplexes

I.1.2.1 „SDS-PAGE“ und „Western“-Analyse: Die Überexpression von *OST3* führt zum fast vollständigen Verschwinden von Ost6p – in Umkehrung nur stark abgeschwächt

Wie unter I.1.1 bereits angedeutet, scheint eine Überexpression von *OST3* in der *ost3*-Disruptante Ost6p aus dem Komplex zu verdrängen. Anders war jedenfalls der in Abb. I.1 beobachtete Wachstumsphänotyp kaum zu interpretieren. Um dies auf Proteinebene zu untersuchen, darüber hinaus auch noch den komplementären Fall, eine mögliche Verdrängung von Ost3p durch Überexpression von *OST6* in *ost6*Δ zu betrachten, wurden die entsprechenden Stämme in Selektivmedium auf OD₅₇₈ zwischen 8 und 9 angezogen, Membranen isoliert und je 25 μg Protein auf einem SDS-Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt und über Western-Analyse analysiert (Abb. I.2, I.3).

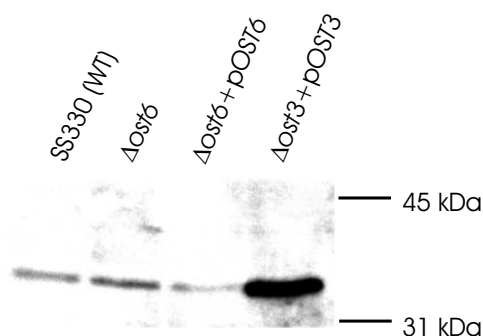


Abbildung I.2: Auswirkungen der Überexpression bzw. Deletion von *OST6* auf Ost3p

SS330 ist der isogene WT zu *ost6*Δ. Spur *ost3*Δ - hier nicht gezeigt - war ohne jedes Signal.

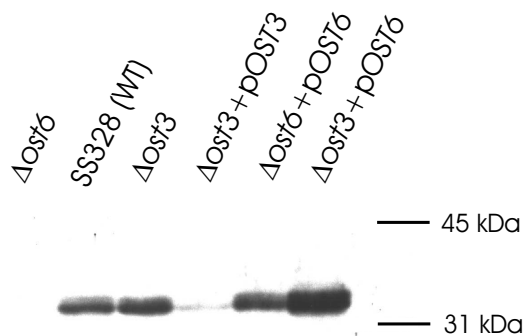


Abbildung I.3: Auswirkungen der Überexpression bzw. Deletion von *OST3* auf Ost6p

SS328 ist der isogene WT zu *ost3*Δ.

Die mittels Bio-Rad Multi-AnalystTM/PC Version 1.1 durchgeführte Quantifizierung ist in Tabelle I.1 wiedergegeben.

Folgendes läßt sich klar erkennen: Wie bereits aus den Wachstumstests gemutmaßt, scheint eine Überexpression von Ost3p in *ost3*Δ das Ost6p bis auf 20 % zu verdrängen. Hingegen wirkt sich eine Überexpression von Ost6p auf den Ost3p-Spiegel in nur viel geringerem Umfange aus: In *ost6*Δ + p*OST6* finden sich immerhin noch ca. 60 % Ost3p. Reziprok dazu nimmt die Menge an Ost6p im Vergleich zum WT um ca. 40 % zu und sollte daher im Komplex gebunden sein. Dagegen ist wohl freies Ost6p instabil und damit nicht detektierbar. Denn daß infolge Überexpression bedeutend mehr Ost6p in der Zelle entsteht, als die hier beobachtete Zunahme um nur 40 %, geht aus der Überexpression von Ost6p in *ost3*Δ hervor: Da das Ost6p strukturell Ost3p sehr ähnlich ist, kann es in *ost3*Δ auch die „Fehlstellen“ im OST-Komplex besetzen, die das Nichtvorhandensein von Ost3p nach sich zieht. Folgerichtig bemißt sich die hier bestimmte Menge an Ost6p auf

Tabelle I.1: Quantifizierung der Western-Analyse von Ost3p bzw. Ost6p

Die hier präsentierten Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit jeweils zwei weiteren Untersuchungen überein.

Membranen	% Ost3p	± Wildtyp	Membranen	% Ost6p	± Wildtyp
SS330 (WT)	100	0	SS328 (WT)	100	0
<i>ost6</i> Δ	112	+ 12	<i>ost3</i> Δ	127	+ 27
<i>ost6</i> Δ + p <i>OST6</i>	59	- 41	<i>ost3</i> Δ + p <i>OST3</i>	20	- 80
<i>ost3</i> Δ + p <i>OST3</i>	514	+ 414	<i>ost6</i> Δ + p <i>OST6</i>	138	+ 38
–	–	–	<i>ost3</i> Δ + p <i>OST6</i>	242	+ 142

142 % relativ zum WT. Bei natürlicherweise gleicher Menge an Ost3p und Ost6p und totaler Instabilität der freien Ost6-Untereinheit wäre ein Plus von ca. 100 % zu erwarten. Es wird noch zu diskutieren sein, ob es *einen* Komplex mit sowohl Ost3p als auch Ost6p oder nicht vielmehr *zwei unterschiedliche* Komplexe mit je einer dieser Untereinheiten gibt; wobei in letzterem Falle diese beiden Komplexe natürlich nicht zwingend im gleichen Umfang in der Zelle vorhanden sein müssen. So kann die beobachtete Zunahme von Ost6p um 142 % bzgl. des Wildtyps sowohl auf einen doch unvollständigen Abbau freier Untereinheiten als auch auf einen Überschuß des zu postulierenden OST3-Komplexes gegenüber dem prospektiven OST6-Komplex hinweisen.

Nach diesen Ergebnissen scheint also Ost3p deutlich affiner an den OST-Komplex zu binden als Ost6p. Auch hinsichtlich der Stabilität in freiem Zustand scheinen Unterschiede zu bestehen: Die Überexpression von Ost3p in *ost3*Δ führt rund zu einer Verfünffachung der im WT gemessenen Menge. Für den Fall, daß Ost3p und Ost6p in gleichen Mengen im oder in den OST-Komplex(en) vertreten wären, blieben noch 80 % abzuziehen, die Größenordnung, in der Ost6p aus dem Komplex verdrängt wird. 100 % sitzen an den nativen Ost3-Positionen. Es bleiben noch mindestens 320 % Überschuß, der aller Wahrscheinlichkeit nach frei, das heißt nicht komplexgebunden, in der Membran vorhanden zu sein scheint. Ost3p ist wohl also in nicht komplexgebundener Form ungleich stabiler als Ost6p. Dabei handelt es sich jedoch möglicherweise nur um eine relative Stabilität, denn ein Abbau scheint auch hier, bei geringerer Menge, sehr wohl statt zu finden: Im Stamm *ost6*Δ + p*OST6* geht die Menge an Ost3p ja gegenüber dem WT um 41 % zurück. Wäre freies Ost3p ähnlich stabil wie komplexgebundenes, wäre kein so großer Rückgang zu erwarten.

Ziemlich sicher scheint also überexprimiertes Ost6p in Abwesenheit von Ost3p sämtliche Fehlstellen besetzen zu können (siehe *ost3*Δ + p*OST6*). Ein analoges Experiment für Ost3p fehlt zwar, doch dessen Vermögen sogar in Anwesenheit von Ost6p dieses auf nur 20 % Restbestand zu verdrängen, spricht für mindestens die gleiche Fähigkeit, unbesetzte „Ost6p-Plätze“ einnehmen zu können. Um verlässlichere Aussagen über die Komplexbindung der hier untersuchten Untereinheiten sowie zum Thema *ein* Komplex mit *beiden* Untereinheiten oder *zwei* Komplexe mit jeweils nur *einer* der beiden Untereinheiten zu erhalten, wurde im Folgenden der Gesamtkomplex über Nativgelelektrophorese untersucht.

I.1.2.2 „Blue Native PAGE“ und „Western“-Analyse des OST-Gesamtkomplexes: Hinweise auf die Existenz ausschließlich Ost3p und ausschließlich Ost6p enthalten- der OST-Komplexe

Um mehr Sicherheit bezüglich der obigen Interpretationen zu gewinnen, was die gegenseitige Verdrängung/Ersetzung der komplementären Untereinheiten Ost3p und Ost6p im Komplex anlangt, und Aussagen hinsichtlich der Komplexorganisation (beide Untereinheiten in einem Komplex, oder zwei distinkte Komplexe) zu erhalten, werden hier nicht publizierte „Blue Native PAGE“-Daten von Herrn Dr. Roland Knauer herangezogen und interpretiert.

Zunächst soll dies hinsichtlich der zweiten Frage geschehen, ob es zwei separate OST-Komplexe, einen mit Ost3p, einen mit Ost6p, oder aber einen einzigen Komplex mit beiden Untereinheiten im äquimolaren Verhältnis gibt.

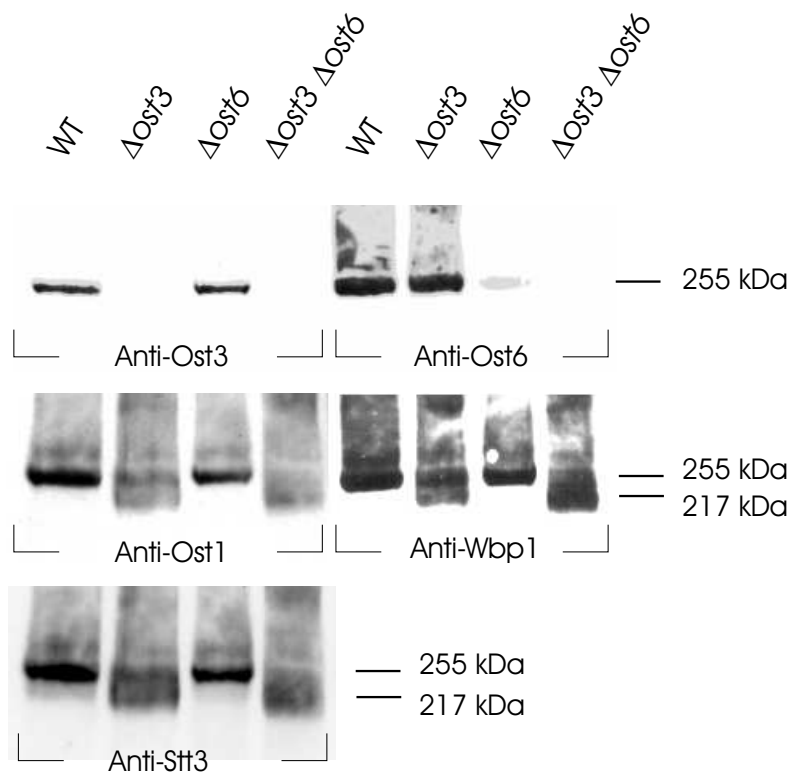


Abbildung I.4: „Blue native PAGE“ und „Western Blot“-Analyse von Wildtyp (WT), $ost3\Delta$, $ost6\Delta$ sowie $ost3\Delta ost6\Delta$ mit den angegebenen Antikörpern: Jede waagerechte Reihe spiegelt eine Dekoration desselben Blot-Paares wider, das dann nach „Stripping“ mit dem nächsten Antikörper dekoriert wurde (2. bzw. 3. Reihe)

In Abb. I.4 werden sowohl die Einzeldisruptanten als auch die Doppeldisruptante $ost3\Delta ost6\Delta$ im Vergleich zum Wildtyp (WT) hinsichtlich des Molekulargewichts des Gesamtkomplexes und des Vorhandenseins verschiedener Untereinheiten untersucht. In der ersten waagerechten Reihe ist die Detektion von Ost3p bzw. Ost6p dargestellt. Sowohl beim WT wie den Einzeldisruptanten ist eine distinkte Bande eines apparenten Molekulargewichts von etwa 255 kDa nachzuweisen. Das heißt, in $ost6\Delta$ bzw. $ost3\Delta$ liegen OST-Komplexe von WT-Molekulargewicht vor.

Dies bedeutet, daß – für die Annahme *eines* Komplexes mit natürlicherweise *beiden* Untereinhei-

ten – augenscheinlich nur OST-Komplexe ohne Fehlstellen stabil sind, das heißt in denen beide, die Ost3p- und die Ost6p-Position, nunmehr mit der noch vorhandenen Untereinheit besetzt sind. Oder aber es handelt sich um zwei distinkte Komplexe mit jeweils einer der komplementären Untereinheiten, von denen bei Detektion mit Anti-Ost3p bzw. Anti-Ost6p eben nur der mit der jeweils vorhandenen Untereinheit detektiert wird.

Diese letztere Möglichkeit manifestiert sich bei Analyse der zweiten und dritten Reihe aus Abb. I.4. Hier erfolgt die Detektion mit Antikörpern gegen Untereinheiten, die unabhängig von Ost3p und Ost6p in jedem Falle Bestandteil des Komplexes sein sollten: Anti-Ost1, Anti-Wbp1 und Anti-Stt3. In der Doppeldisruptante ist nun ein Shift um ca. 38 kDa hinsichtlich des WT (auf ca. 217 kDa) zu beobachten. Das entspricht in etwa dem kalkulierten Molekulargewicht sowohl von Ost3p als auch Ost6p (37 kDa), würde also in jedem Fall für den Verlust nur einer Untereinheit sprechen. Bei *ost3Δ* existieren im Gegensatz zum WT scheinbar *zwei* Komplexe: Einer vollständigen Molekulargewichts – in Form einer scharfen, etwas dominanteren Bande – und einer von etwa 217 kDa, ebendesselben Gewichts des Komplexes der Doppeldisruptante. Da der Komplex vollständigen Gewichts (die Bande also bei 255 kDa) bei Dekoration mit Ost6p-Antikörper als einzige detektierbare Bande und dabei von WT-Molekulargewicht auftritt, muß es sich um einen *vollständigen* Komplex mit *ausschließlich* der Ost6p-Untereinheit handeln. Was deutlich **gegen einen Komplex mit beiden** Untereinheiten spricht.

Dies wird weiter erhärtet durch die in Abb. I.5 und I.6 jeweils im linken Teil ($\Delta ost3$) dargestellten Ergebnisse. Wie bereits in Abb. I.4 ist auch hier bei Detektion mit dem Ost6p-Antikörper nur eine Bande von WT-Molekulargewicht (ca. 255 kDa), dagegen bei Verwendung von Anti-Wbp und Anti-Ost1 zusätzlich eine zweite, leichtere, etwas verwaschene Bande bei ca. 217 kDa vorhanden.

Im Weiteren soll nun zunächst der Frage nachgegangen werden, in wieweit eine gegenseitige Ersetzung/Verdrängung in Hinsicht auf die beiden komplementären Untereinheiten Ost3p und Ost6p möglich ist. Die Auswirkung einer Überexpression von Ost3p in der Einfachdisruptante *ost3Δ* ist in Abb. I.5 zu sehen: Die in *ost3Δ* links durch Anti-Wbp1 und Anti-Ost1 nachzuweisende leichtere Bande von etwa 217 kDa verschwindet bei Überexpression von *OST3* über ein Multicopyvektor-Konstrukt zugunsten der 255 kDa-Bande, die nun auch durch Anti-Ost3 nachweisbar wird. Demnach wurde erwartungsgemäß der Ost3p entbehrende 217 kDa-Komplex durch das vektorexprimierte Ost3p zum vollständigen Komplex ergänzt.

Doch bestätigt sich nun auch hier, bei Untersuchung des nativen Komplexes, die aus den Ergebnissen unter denaturierenden Bedingungen (Abb. I.3) zuvor gefolgerte Verdrängung von nativem Ost6p aus dem Komplex durch überexprimiertes Ost3p? Trotz aller Problematik der Quantifizierung von „Western Blots“ aus „Blue native PAGE“ scheint das hier doch zu bejahen. Bei Vergleich des Ost6p-Signals in *ost3Δ* mit *ost3Δ+pOST3* wird offenkundig, daß die Intensität des bei Ost3p-Überexpression beobachteten Signals nur noch einen Bruchteil des Signals von *ost3Δ* darstellt. Wogegen die hier in gewisser Weise als „Kontrolle“ anzusehenden Banden von Anti-Wbp/Anti-Ost1 im Falle der Überexpression von Ost3p sogar intensiver sind.

Die Verdrängung von Ost6p durch überexprimiertes Ost3p aus dem Komplex, wie sie sowohl aus der denaturierenden „PAGE/Western Blot“-Analyse als auch aus den Wachstumstests (Abb. I.1) abgeleitet wurde, bestätigt sich also auch für den nativen Komplex.

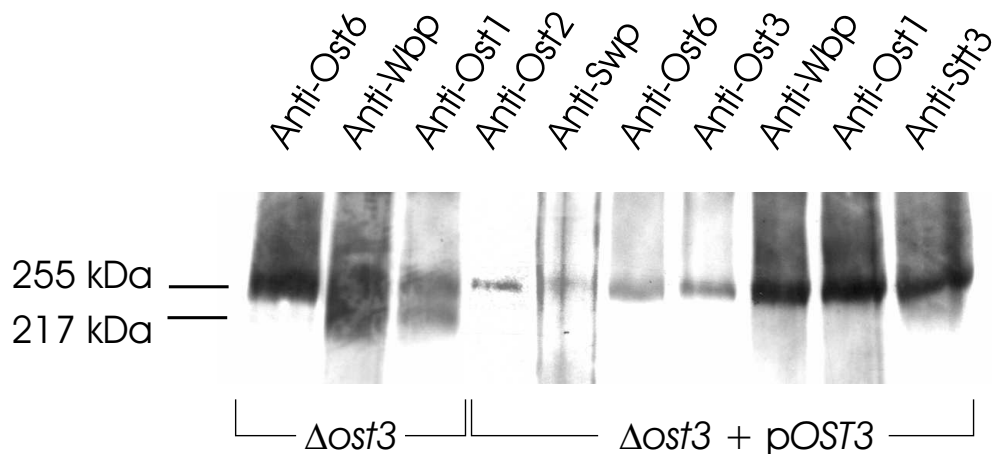


Abbildung I.5: „Blue native PAGE“ und „Western Blot“-Analyse von $ost3\Delta$ sowie der Überexpression von Ost3p in $ost3\Delta$ mit den angegebenen Antikörpern

Nun zur Frage, ob Ost6p in Überexpression, wie bereits aus der denaturierenden PAGE/Western Blot-Untersuchung in Abb. I.3 ($ost3\Delta + pOST6$) abgeleitet, tatsächlich auch im Komplex fehlendes Ost3p in einer $ost3\Delta ost6\Delta$ -Doppeldisruptante ersetzen kann. Abbildung I.6 gibt darüber Aufschluß:

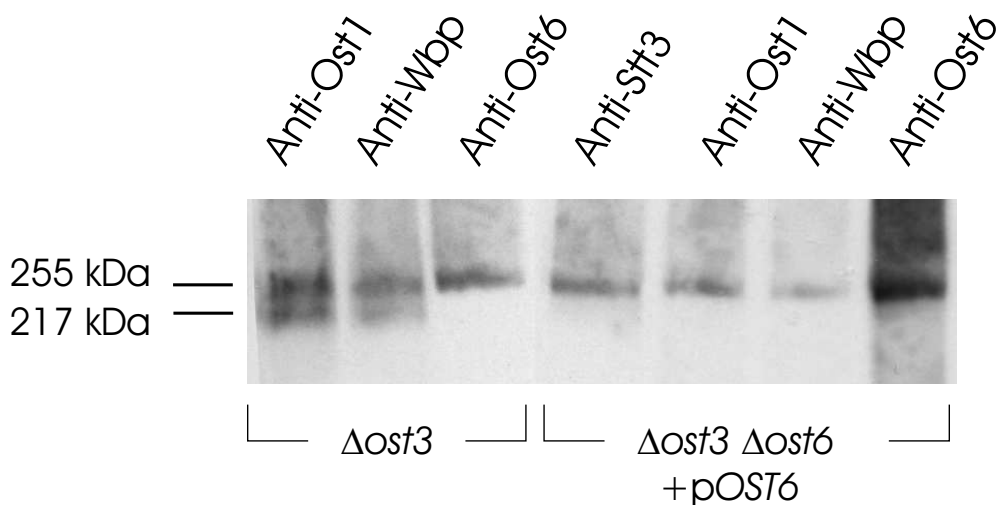


Abbildung I.6: „Blue native PAGE“ und „Western Blot“-Analyse von $ost3\Delta$ sowie der Überexpression von Ost6p in $ost3\Delta ost6\Delta$ mit den angegebenen Antikörpern

Das Bild für $ost3\Delta$ ist vollkommen deckungsgleich mit dem entsprechenden Teil aus Abb. I.5 und bedarf keiner weiteren Interpretation. Die Überexpression von Ost6p in der Doppeldisruptante führt nun zum vollständigen Verschwinden der leichteren Bande von 217 kDa. Allein die 255 kDa-Bande des vollständigen OST-Komplexes ist vorhanden. Dazu erscheint sie besonders intensiv (mehr als doppelte Intensität) im Falle der Ost6p Überexpression und Anti-Ost6-Dekoration im Vergleich zu $ost3\Delta$. Beides deutet stark darauf hin, daß das im Überschuß vorhandene Ost6p nun

auch die „Fehlstellen“ von Ost3p besetzt hat: Es gibt nurmehr ausschließlich vollständige Komplexe, und der zuvor Ost3p entbehrende, leichtere Part, nun von Ost6p vervollständigt, verstärkt entsprechend das Ost6p-Signal in der Anti-Ost6-Dekoration.

Auch die Nativgelelektrophorese bestätigt also die „Ersetzbarkeit“ von Ost3p durch Ost6p, wenn ersteres nicht vorhanden und letzteres überexprimiert vorliegt.

Folgende Argumente sprechen nun also für die Existenz zweier distinkter OST-Komplexe, die sich durch den Besitz von *entweder* Ost3p *oder* Ost6p unterscheiden:

- In der Doppeldisruptante *ost3Δ ost6Δ* läuft der Komplex bei einem Molekulargewicht von etwa 217 kDa, also ca. 38 kDa leichter als der Wildtyp. Da Ost3p wie Ost6p jeweils ein kalkuliertes Molekulargewicht von etwa 37 kDa haben sollen, entspricht dieser Shift dem Fehlen nur *einer* Untereinheit.
- *ost3Δ* zeigt bei Dekoration mit Anti-Ost6p nur *eine* Bande und zwar von WT-Molekulargewicht (255 kDa). Das heißt, Ost6p befindet sich *ausschließlich* in dieser Fraktion. Bei Dekoration mit Antikörpern gegen andere OST-Untereinheiten hingegen erscheint eine zweite Bande von ca. 217 kDa, also etwa 38 kDa leichter als der vollständige OST-Komplex, was dem Fehlgewicht von *einer* Untereinheit entspricht. Gäbe es *einen* Komplex mit *beiden* Untereinheiten – nur eine Bande mit ca. 37 kDa Fehlgewicht zum Vollkomplex wäre zu erwarten, die sowohl mit Anti-Ost6 wie mit Antikörpern gegen andere Untereinheiten außer Ost3p zu dekorieren sein sollte.
- Bei der leichteren Bande aus *ost3Δ* handelt es sich mit Sicherheit um eine OST-Fraktion, die dieser Untereinheit entbehrt: Bei Überexpression von Ost3p im gleichen Stamm verschwindet diese Bande zugunsten des vollständigen Komplexes. Auch die Überexpression von Ost6p vermag die leichtere Bande vollständig zum 255 kDa-Komplex zu shiften.

Bleibt die Frage, warum nicht auch bei *ost6Δ*, wie bei *ost3Δ*, die Dekoration mit Antikörpern gegen Untereinheiten verschieden von Ost3/6p zum Nachweis auch einer leichteren Bande führt. Zunächst existieren Hinweise darauf, daß der OST6-Komplex gegenüber dem OST3-Komplex im Unterschuß vorhanden ist. Vergleicht man in Abb. I.4 in den drei verschiedenen Antikörperdekorationen Anti-Ost1, Anti-Wbp1 und Anti-Stt3 jeweils *ost3Δ* (spiegelt - siehe oben - mit der 255 kDa-Bande den Anteil OST6-Komplex wider) mit *ost6Δ* (spiegelt mit der 255 kDa-Bande den Anteil OST3-Komplex wider), gilt für alle drei Dekorationen, daß die Komplexbande von *ost6Δ* ungleich intensiver ist als die 255 kDa-Bande von *ost3Δ*. Was nichts anderes als einen deutlichen Überschuß an OST3-Komplex gegenüber dem OST6-Komplex bedeuten kann. Auch aus der SDS-PAGE (Abb. I.3) läßt sich Ähnliches ableiten: Es war gefolgert worden, Ost6p wäre frei, d. h. nicht komplexgebunden, sehr instabil und damit nicht nachweisbar. Im Falle von *ost3Δ+pOST6* jedoch war gegenüber dem WT eine Zunahme um + 142 % zu beobachten. Also würden diese + 142 % der Anzahl an OST3-Komplexen entsprechen, da in diesem Stamm nun Ost6p die Stelle des fehlenden Ost3-Proteins einnimmt. Bei einem Verhältnis von Ost3p/Ost6p = 1/1 wären + 100 % im Vergleich zum WT zu erwarten gewesen. Dies könnte bedeuten, daß der OST6-Komplex gegenüber dem OST3-Komplex um etwa 30 % im Unterschuß vorliegt (für 142 = 100 % Ost3p, 100/1,42 = 70,4 % Ost6p). Exakte quantitative Aussagen lassen diese Beobachtungen zwar nicht zu, doch liegt die Annahme nahe, daß der postulierte OST3-Komplex gegenüber dem postulierten OST6-Komplex in nicht zu vernachlässigendem Überschuß vorliegt.

Eine weitere Annahme scheint ebenfalls zulässig: OST-Komplexe mit unbesetzter Ost3- bzw. Ost6-Position sind instabiler als komplette Komplexe und werden entweder bereits in der Zelle schneller abgebaut oder aber zerfallen teilweise während der Elektrophorese. Letztere Annahme ist weniger wahrscheinlich, da abgesehen von der etwas diffuseren 217 kDa-Bande kein „Schmier“ hin zu leichterem Molekulargewicht zu beobachten ist. Der leichteste Standard am unteren Gel-Ende war das BSA-Monomer mit 66 kDa, d. h. nur Aggregate kleiner als 66 kDa könnten „ausgelaufen“ sein.

Die Grundlage für diese „Instabilitäts-Annahme“ ist der Vergleich der Intensität der 217 kDa-Bande der Doppeldisruptante in Abb. I.4 mit der des Wildtyps: Das Signal ist um etliches schwächer und sollte doch theoretisch bei gleichem Antikörper ähnlich intensiv sein. Dies ist für drei verschiedene Antikörper (diese Abb.) sowie drei verschiedene „Western Blots“ gezeigt. Auch sollten theoretisch die 217 kDa- und die 255 kDa-Bande in *ost3Δ* zusammengenommen eine ähnliche Intensität wie die 255 kDa-Bande des WT ergeben, was ebensowenig der Fall ist (Abb. I.4). Postuliert man die Reduzierung der 217 kDa-Bande durch Abbau, kommt das Bild wieder ins Lot.

Beide Hypothesen zusammen genommen können nun die Abwesenheit einer leichteren Bande bei *ost6Δ* plausibel machen:

Die normalerweise Ost6p enthaltende Komplexfraktion, die ja in *ost6Δ* die (nicht vorhandene) 217 kDa-Fraktion stellen sollte, ist, wie oben abgeleitet, ohnehin im Unterschuß relativ zum OST3-Komplex vorhanden. Dazu kommt nun ein verstärkter Abbau dieser unvollständig besetzten OST-Fraktion. Gemeinsam könnte dies die Reduktion der 217 kDa-Fraktion bis unter die Nachweisgrenze bedingen. Dagegen könnte gerade in *ost3Δ*, wo ja die 217 kDa-Fraktion auftritt, selbige durch einen weiteren Effekt stabilisiert werden: Wie aus den Verdrängungsexperimenten aus Unterkapitel I.1.2.1 hervorgeht, besitzt Ost3p eine ungleich größere Komplexaffinität als Ost6p, letzteres ist also weniger fest mit dem Komplex assoziiert. In *ost3Δ* sind nun zwar die Ost6p-Untereinheiten „Mangelware“, können also bei weitem nicht alle OST-Komplexe bedienen. Andererseits folgt aus der wohl größeren Dissoziationskonstante die Möglichkeit eines ausgeprägteren „Komplex-Hoppings“, was zu begrenzter Stabilisierung der an sich relativ instabilen, weder von Ost3p noch von Ost6p besetzten Komplexfraktion führen könnte. Andererseits ist, wie ebenfalls unter I.1.2.1 abgeleitet, Ost3p in freiem Zustand sehr stabil, ganz im Gegensatz zu Ost6p. Im ER könnte daher ein gewisser „Ost3p-Puffer“ an freien Untereinheiten vorliegen, der im Falle von *ost6Δ* einen Teil der unbesetzten OST6-Komplexe“ auffängt, die dann als OST3-Komplex in die 255 kDa-Fraktion mit eingehen (und natürlich so einen höheren OST3-Komplex -Anteil, als er im WT vorliegt, vortäuschen könnten).

So kämen also möglicherweise einmal der per se geringere Anteil an OST6-Komplex, die Instabilität des 217 kDa-Komplexes und das möglicherweise vorhandene Pufferpotential freier Ost3p-Untereinheiten im ER zusammen und führten in *ost6Δ* zur Reduktion des 217 kDa-Komplexes bis unter die Nachweisgrenze. Andererseits könnte ein aufgrund geringerer Komplexaffinität der Ost6p-Untereinheit im Vergleich zu Ost3p in *ost3Δ* durch „Komplex-Hopping“ zu einer gewissen Stabilisierung der 217 kDa-Fraktion führen (die in diesem Falle aufgrund des Überwiegens des OST3-Komplexes ohnehin massiver vorhanden ist als in *ost6Δ*).

I.2 Ein neues Solubilisierungsverfahren für den OST-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*

Für weitere Untersuchungen am OST-Komplex (Crosslinking-Experimente) sollte ein besonders aktives und vor allem auch stabiles Solubilisat zur Verfügung stehen. Das von R. Knauer [64, 65] übernommene und noch etwas optimierte Verfahren ($[P]_{\text{zur Solubilisierung}} = 9.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; Nikkol/Protein = $2.04 \text{ nmol}/\mu\text{g}$; $[\text{KCl}] = 0.5 \text{ M}$; 1.8 mM PC) lieferte zwar zufriedenstellende Aktivität, erwies sich aber bei 4°C als wenig stabil. Die Oligosaccharyltransferaseaktivität des Solubilisats war nach 24 Stunden auf 10 % Restaktivität zurückgegangen.

Aus diesem Grunde wurde in den umfangreichen Solubilisierungsexperimenten mit DHPC zur Gewinnung von DolPPGlcNAc₁ (siehe II.2.2) jeweils auch ein OST-Experiment durchgeführt.

Tabelle I.2: Solubilisierungseffizienz in Abhängigkeit vom DHPC zu Protein-Verhältnis sowie der Salz-Konzentration.

Die Solubilisierungen erfolgten jeweils bei $[P] = 6.47 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Je Reaktion ($50 \mu\text{l}$ Endvol.) wurde Solubilisat aus $194.4 \mu\text{g}$ Membranprotein ($30 \mu\text{l}$), 4000 cpm DolPP- ^{14}C GlcNAc₂ sowie 4 mM Hexapeptid (YNLTSV) eingesetzt und 10 Minuten bei 24°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktionen und weitere experimentelle Details sind unter A.2.10.2 beschrieben. Entstandenes Glykopeptid wurde über Szintillationszählung quantifiziert.

	OST-Aktivität [cpm]								
	DHPC/Protein [nmol/ μg]								
Salz [M]	5.9	2	1.56	1.5	1	0.7	0.5	0.45	0.4
KCl 0.5				50					
NaCl 0.15	108		269						
NaCl 0.5	35	56	139	267	135				
NaCl 0.8				660	963	998	873		
NaCl 1.0					1107	1054			
NaCl 1.2					1109		999		877
NaCl 1.5							919		

Aus der Übersicht über die durchgeführten Experimente in Tab. I.2 lassen sich folgende Tendenzen erkennen:

1. Wie schon für die Aktivität von Alg7p zu beobachten war (vgl. Tab. II.1 und Text dazu), scheint KCl in Verbindung mit DHPC auch für die OST nicht vorteilhaft, es fand praktisch kein Umsatz statt. Für eine Diskussion dieser Beobachtung siehe II.2.2.
2. Bei hohen Detergenskonzentrationen ($D/P = 5.9 - 1.56$) sind hohe Salzkonzentrationen abträglich. Hier spiegelt sich wohl die für DHPC beschriebene cmc-Erniedrigung mit steigender Salzkonzentration wider [30] (vgl. II.2.2). Bei niedrigeren Detergenskonzentrationen kehrt sich dieser Effekt um.
3. Bis zu einer Erniedrigung des DHPC/Protein-Verhältnisses auf 1 und gleichzeitig steigender Salzkonzentration steigt die OST-Aktivität. Auch bei hohen Salzkonzentrationen wirkt sich eine weitere DHPC-Reduzierung negativ aus.

4. Das Optimum der Salzkonzentration scheint bei 1.2 M erreicht zu sein. Bei 1.5 M geht jedenfalls für DHPC/Protein = 0.5 die Aktivität wieder leicht zurück.

Das Aktivitätsoptimum bei 1.2 M NaCl und DHPC/Protein = 1 von 1109 cpm war zwar interessant insofern, als daß auch die OST auf Hochsalzbedingungen positiv reagiert. Eine etwas höhere Aktivität wäre jedoch noch wünschenswert gewesen. Deshalb wurde nun das Optimum für die Salzkonzentration beibehalten (1.2 M), dagegen unter diesen Bedingungen eine Nikkol-Solubilisierung (D/P = 3.1 nmol/ μ g und 1.8 mM PC [65]) mit einer NP40-Solubilisierung (D/P = 1.66 nmol/ μ g) verglichen. Sonst waren die Reaktionsbedingungen wie in Tab. I.2 beschrieben.

- 1.2 M NaCl, **Nikkol/P** = 3.1, 1.8 mM PC: **541 cpm**;
- 1.2 M NaCl, **NP40/P** = 1.66: **1597 cpm**;

Demnach ist das Ergebnis der Nikkol-Solubilisierung unbefriedigend. Wie ebenfalls unter II.2.2 diskutiert, sind möglicherweise für eine Nikkol-Solubilisierung K^+ -Ionen besser geeignet als Na^+ -Ionen. Oder aber es wirkt sich die hohe Detergensenmenge unter gleichzeitig hohen Salzkonzentrationen negativ aus.

Der Einsatz von NP40 (D/P = 1.66) dagegen war ein Erfolg. Rund 1600 cpm gebildetes Glykopeptid entspricht mindestens der Aktivität im bisher über Nikkol/KCl-Solubilisierung gewonnenen Enzymextrakt. Dabei allerdings war die Proteinkonzentration zur Solubilisierung 9.1 μ g/ μ l, wogegen hier nur 6.47 μ g/ μ l Membranprotein eingesetzt worden waren. Darüber hinaus erfolgte hier kein Zusatz von Phosphatidylcholin (PC).

Nachdem nun eine alternative Solubilisierungsmethode mit hoher Aktivität entwickelt worden war, interessierte die *Stabilität* dieser Enzympräparation bei 4°C. Daher wurde die Entwicklung der Aktivität im beschriebenen NP40/NaCl-Solubilisat über 3 Tage (72 Stunden) bei 4°C verfolgt (Abb. I.7). Die Enzympräparation zeigt sich hoch stabil: Nach zwei Tagen bei 4°C wurden relativ zum Ausgangspunkt noch immer 81 % Aktivität gemessen, nach 3 Tagen noch 78 % Restaktivität. Und dies ohne jede Stabilisierung durch exogen zugesetzte Phospholipide. Eine weitere Steigerung der Aktivität des Enzymextraktes ließ sich durch Solubilisierung bei einer Proteinkonzentration von 11.55 statt 6.47 μ g/ μ l bei gleichem D/P-Verhältnis (1.66 nmol/ μ g) und gleicher Salzkonzentration (1.2 M NaCl) erzielen. Mit nur 16 μ l Solubilisat war bereits nach 10 Minuten ein quantitativer Umsatz erfolgt. Für die experimentellen Details zur Solubilisierung siehe A.2.10.1.

Wie läßt sich nun das obsolet werden einer Lipidstabilisierung durch exogenes PC bei gleichzeitig wesentlich besserer Enzymstabilität erklären? Zwei miteinander vereinbare Möglichkeiten kommen in Betracht, die beide (vgl. II.2.2) auf der hohen NaCl-Konzentration beruhen.

Einmal könnte die Intensivierung hydrophober Wechselwirkungen durch die hohe Ionenstärke dazu führen, daß die native Lipidumgebung des Komplexes erst gar nicht abhanden kommt. Denn obgleich sich PC *in vitro* günstig auswirken mag: Die native Lipidzusammensetzung ist sicherlich ungleich komplexer und wird die Katalyse wirkungsvoller unterstützen. Aufschluß über die Vielzahl von Parametern, die dabei eine Rolle spielen, gibt eine Veröffentlichung von Jensen und Schutzbach zur Rekonstitution der α 1,3-Mannosyltransferase aus Kaninchenleber (Alg2p-Homolog) [49]. Der Grad der Aktivierung des Enzyms war bei Rekonstitution in Liposomen einer einzigen Lipidspezies gleichzeitig von Kopfgruppe und Fettsäurerest abhängig. Allem Anschein nach fand eine Enzymstimulierung nur statt, wenn das Lipid bei der gegebenen Testtemperatur in der Gelphase war. Beim Übergang zur flüssig kristallinen Phase verlor das Enzym seine Aktivität. Die Phasenübergangstemperatur eines reinen Lipids hängt sowohl von Kopfgruppe als auch Fettsäurerest ab. Noch komplizierter gestaltet sich das Verhalten der Enzymaktivität im Zweikomponenten-Lipidsystem aus Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin: Obgleich

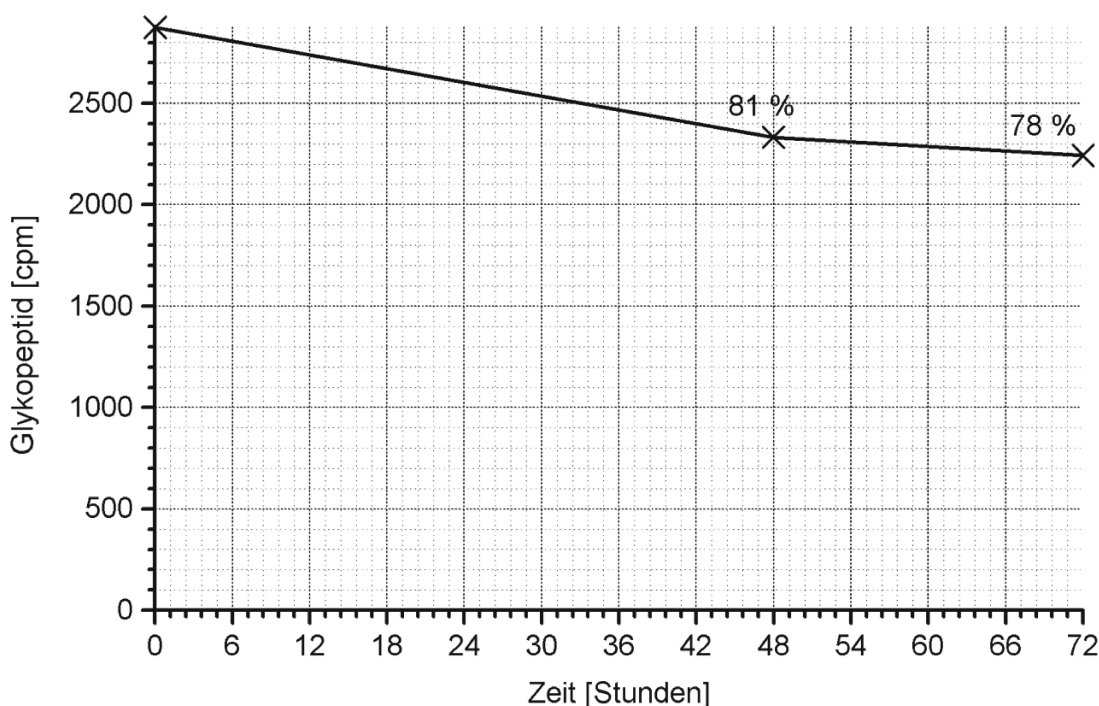


Abbildung I.7: Stabilität des OST-Extraktes aus NP40/NaCl-Solubilisierung bei 4°C

Solubilisierung: [P] = 6.47 µg/µl; NP40/P = 1.66 nmol/µg; [NaCl] = 1.2 M. **OST-Reaktion:** 30 µl Solubilisat wurden mit 4000 cpm DolPP[¹⁴C]GlcNAc₂ und 3 mM 14er-Peptid in einem Endvolumen von 50 µl 10 Minuten bei 24°C inkubiert.

beide mit den jeweils geeigneten Fettsäureresten für sich die Enzymaktivität stark stimulierten (100 % bzw. 86 %), ergab eine Mischung von 1:1 nurmehr 50 %, von 1:5 nurmehr 35 % Aktivität. Ein Erhalt der spezifischen Lipidumgebung aufgrund der hohen Ionenstärke könnte also durchaus ein Grund für die hohe und stabile Aktivität sein.

In die gleiche Richtung geht die zweite Möglichkeit: Auch der Zusammenhalt des sonst fest in der ER-Membran verankerten Komplexes aus 9 (bzw. 8 für distinkte OST3/OST6-Komplexe, vgl. I.1.2.2) Untereinheiten [67] könnte durch die hohe Ionenstärke stabilisiert werden. Denn auch hier spricht viel dafür, daß zumindest *auch* hydrophobe Wechselwirkungen im Spiel sind. Deletiert man nämlich *OST4*, das Gen für die kleinste, praktisch nur aus einer Transmembranhelix bestehende Untereinheit, so zerfällt der postulierte aus Stt3p, Ost3p und Ost4p bestehende Subkomplex (keine Koimmunopräzipitation mehr möglich [51, 61]). Dieser augenscheinliche Verlust an Zusammenhalt der Untereinheiten tritt auch ein, wenn Einzelaminosäureaustausche von hydrophoben/neutralen AS zu Lysin in einem 7-AS langen Abschnitt (Teil der postulierten Transmembrandomäne) erfolgten. Dabei erwiesen sich AS-Austausche, die eine Reduktion der Transferaseaktivität und Temperatursensitivität bedingten (wie dies auch für *ost4Δ* der Fall ist), als komplexdestabilisierend, wohingegen Austausche, die phänotypisch folgenlos blieben, auch in der Koimmunopräzipitation erfolgreich waren [61]. Viel spricht also dafür, daß Ost4p allein durch Wechselwirkung seiner Transmembranhelix mit wahrscheinlich Ost3p und Stt3p zur Komplexstabilität entscheidend beiträgt. Detergens würde nun gerade diese wohl auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Interaktionen schwächen. Hohe Ionenstärke im Solubilisat könnte dem entgegen wirken.

Kapitel II

Synthese von Lipid gebundenen Oligosacchariden in Hefe

II.1 Optimierung der DolPP-GlcNAc₂-Synthese

Da DolPP-GlcNAc₂ zum einen das Standardsubstrat (Minimal-Donorsubstrat) für den Oligosaccharyltransferasetest, andererseits das Akzeptorsubstrat für die LLOM₁-Synthese bzw. für die Mannosyltransferasetests mit GDP-Man als Donor bis LLOM₅ darstellt, ist eine effektive biochemische Synthese sowie ein hoher Reinheitsgrad äußerst wichtig. Das erste dabei aktive Enzym ist die Phosphoglykosyltransferase **GPT**, kodiert von *ALG7*, gefolgt von der Glykosyltransferase **GNT**, deren Gen bislang unbekannt ist (vgl. Einleitung).

Bei der bisherigen Methode, einen NP40-haltigen Prämix aus DolP und UDP-[¹⁴C]GlcNAc mit Rohmembranen aus WT-Zellen umzusetzen, fiel neben dem Produkt auch immer noch unprozessiertes DolPP-GlcNAc₁ sowie ein als Intermediat der GPI-Ankersynthese eingestuftes Nebenprodukt an. Beispielsweise schwankte das Verhältnis der erwähnten Intermediate im Stamm W303a/α (dieser wies aus vier getesteten Wildtyp-Stämmen den höchsten Anteil an DolPP-GlcNAc₂ auf) zwischen 42 und 46 % DolPP-GlcNAc₂, 9 und 22 % DolPP-GlcNAc₁ sowie 49 und 32 % GPI-Ankerlipid.

II.1.1 Kinetik der Reaktionen im NP40-Solubilisat und Verwendung des *gpi1-1*-Stamms

Um die beschriebenen Nebenprodukte zu Gunsten von DolPP-GlcNAc₂ zurückzudrängen, wurde zunächst ein Versuch unternommen, die gewünschten Enzymaktivitäten über Solubilisierung spezifisch anzureichern. Natriumdesoxycholat erwies sich als ungeeignet, mit NP40 konnten positive Resultate erzielt werden. Insbesondere war die Menge des GPI-Ankerlipids deutlich reduziert, wenn darauf geachtet wurde, nur das klare Solubilisat ohne die über dem Pellet befindliche „Gelphase“ abzunehmen und in der Reaktion zu verwenden.

Zur Ermittlung des optimalen Zeitfensters wurden zwei Kinetiken mit NP40-Solubilisat durchgeführt. Die erste war bei NP40/P = 0.26, die zweite bei NP40/P = 0.44 nmol/μg durchgeführt worden (siehe Abb. II.1).

Aus *beiden* Kinetiken wird deutlich, daß zwar bis 80 bzw. 60 Minuten der DolPP-GlcNAc₁-Anteil noch stetig abnimmt, was ja gewollt wäre, allerdings ab etwa 40 Minuten bereits der DolPP-GlcNAc₂-Anteil zu sinken beginnt. Dies könnte auf einer Hydrolyse des Produkts durch die von

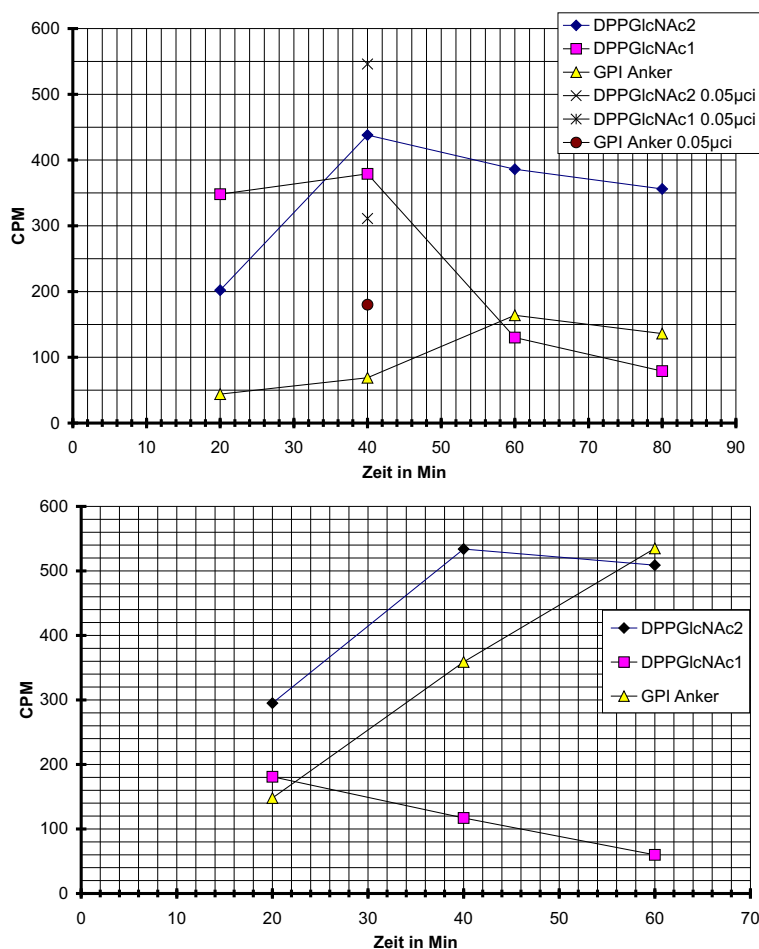


Abbildung II.1: Kinetik DolPP-GlcNAc₂-Bildung, jeweils bei 0.025 μ Ci UDP-[¹⁴C]GlcNAc und 3.5 μ g DolP je Reaktion: **Oben:** NP40/Protein = 0.26 nmol/ μ g **unten:** NP40/Protein = 0.44 nmol/ μ g

Belard *et al.* [5] beschriebene Oligosaccharid-PP-Dol-spezifische Pyrophosphatase beruhen (vgl. II.4.2), deren Aktivität natürlich besonders dann ins Gewicht fällt, wenn die Syntheserate nachzulassen beginnt. Ferner kann auch eine Übertragung des GlcNAc₂-Restes auf endogene Proteine durch im Solubilisat vorhandene OST-Aktivität nicht völlig ausgeschlossen werden. Doch meinen Erfahrungen zufolge findet dies in nur sehr geringem Umfang statt.

Andererseits nimmt in beiden Experimenten die Menge des GPI-Ankerlipids bis 60 Minuten zu. Der wesentlich höhere Anteil an GPI-Ankerlipid bei NP40/P = 0.44 nmol/ μ g (untere Abb.) hat nichts mit der höheren Detergensenkonzentration zu tun. Vielmehr wurde noch nicht genügend darauf geachtet, die Gel-Phase zwischen flüssigem, klaren Solubilisat und festem Pellet zu meiden. Hier scheint die entsprechende Transferase besonders konzentriert zu sein.

Was die Kinetiken klar unterscheidet, ist die niedrigere Ausgangsmenge an DolPP-GlcNAc₁ im unteren Bild, die durchaus auf dem höheren NP40/Protein-Verhältnis beruhen könnte. Das verantwortliche Enzym, Alg7p, ist detergensen sensitiv. Die Aktivität ist aber noch völlig ausreichend, um bei weniger DolPP-GlcNAc₁-Hintergrund zur Zeit 40 Minuten sogar noch mehr DolPP-GlcNAc₂ zu erhalten als bei der geringeren Detergensenkonzentration (obere Abb.), was auch mit einer effek-

tiveren Solubilisierung der GNT bei höherer Detergensenmenge zusammenhängen könnte.

In der Abbildung oben sind noch für die Zeit 40 Minuten die cpm der jeweiligen Produkte für die doppelte Menge radioaktiven Zuckernukleotids, also 0.05 μCi , aufgetragen. Erkennbar wird, daß sich vor allem das Verhältnis DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₁ deutlich vergrößert, aber auch die Absolutmenge an DolPP-GlcNAc₂.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten:

Bei etwa 40 min Inkubationszeit ist die maximale Menge an DolPP-GlcNAc₂ entstanden, die dann im Zeitverlauf wieder sinkt. Dagegen steigt die Menge des einen unerwünschten Nebenprodukts, des GPI-Ankerlipids, noch weiter an.

Durch Einsatz der doppelten Menge radioaktiven Zuckernukleotids wird nicht nur die Absolutmenge an Endprodukt, sondern auch das Verhältnis DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₁ günstig beeinflusst.

Eine höhere Detergensenmenge (Abb. II.1 unten) führt zu einer geringeren Aktivität der ersten Transferase, GPT, und damit zu weniger ungewolltem DolPP-GlcNAc₁, dabei aber sogar zu einer höheren Ausbeute an DolPP-GlcNAc₂, dem gewünschten Produkt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Experimenten die Inkubationszeit auf etwa 40 Minuten beschränkt sowie 0.05 μCi UDP-GlcNAc in die Reaktionen eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Detergensenmenge systematisch optimiert (vgl. II.1.2).

Verringerung der DolPP-GlcNAc₁-Menge über „Chase“ mit kaltem UDP-GlcNAc Ziel war es, durch spätes Zusetzen von kaltem UDP-GlcNAc eine Verlängerung der vorhandenen DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₁-Fraktion zu DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂ zu erreichen, ohne jedoch wesentliche Mengen an kaltem DolPP-GlcNAc_{1/2} zu produzieren und damit die spezifische Radioaktivität zu senken. Optimale Ergebnisse wurden bei einer Inkubation von 35 Minuten bei 24°C und einem sich anschließenden „Chase“ mit 83 μM UDP-GlcNAc_{kalt} über weitere 10 Minuten erreicht (Gesamtkubationszeit 45 Minuten).

Vermeidung des GPI-Anker-Nebenprodukts durch Einsatz des *gpi1-8*-Stamms Der erste Schritt in der GPI-Ankersynthese ist die Bildung von *N*-Acetylglucosaminyl-Phosphatidylinositol. Dieser Schritt führt zum dann in Abb. II.1 detektierten, unerwünschten Nebenprodukt.

Um dies zu verhindern, wurde auf eine Hefemutante mit einem Defekt in diesem Schritt der GPI-Ankersynthese zurückgegriffen, nämlich *gpi1-8* [80–82]. Dieser Stamm ist konditional letal und wächst auch bei der permissiven Temperatur von 25°C äußerst langsam. Auch ohne Induktion bei höheren Temperaturen weist das NP40-Solubilisat aus Membranen dieses Stamms keine *in vitro*-Aktivität mehr hinsichtlich des unerwünschten GPI-Anker Intermediates auf.

Alle weiteren Synthesen von DolPP-GlcNAc₂ wurden deshalb mit Solubilisat aus Membranen dieses Stamms durchgeführt.

II.1.2 Ermittlung des optimalen Detergens/Protein-Verhältnisses

Um nun einerseits die Ausbeute noch weiter zu steigern, andererseits das Verhältnis DolPP-GlcNAc₂/DolPP-GlcNAc₁ zu verbessern (vgl. Abb. II.1 oben – NP40/P = 0.26 – mit unten – NP40/P = 0.44 nmol/ μg), wurde systematisch das Detergens zu Protein-Verhältnis gesteigert:

Anfangen von $\text{NP40/P} = 0.99 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ bis $\text{NP40/P} = 2.9 \text{ nmol}/\mu\text{g}$. Die Inkubationszeit belief sich auf 45 Minuten, allerdings wurde hier *kein* „Chase“ mit kaltem UDP-GlcNAc durchgeführt. Zunächst sollte der Umsatz radioaktiven Zuckernukleotids optimiert werden, unbeeinflusst vom schwer abschätzbaren Einbau kalten Substrats. In Abb. II.2 sind nun die Ergebnisse dargestellt:

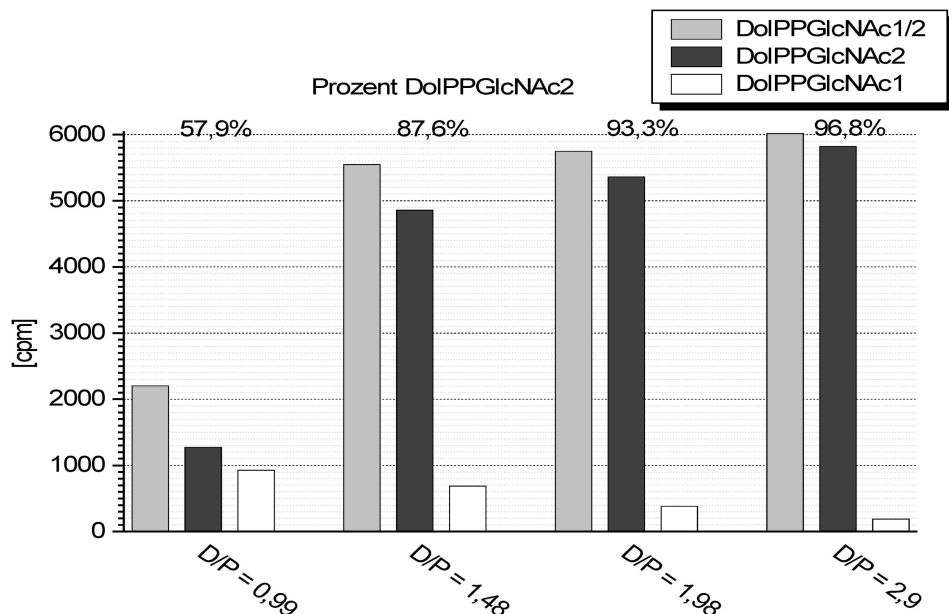


Abbildung II.2: Solubilisierung und Substratgewinnung: Optimierung des NP40/Protein-Verhältnisses zur DolPP-GlcNAc₂-Synthese

0.05 μCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc sowie 3.5 μg DolP je Reaktion. Inkubation 45 Minuten bei 24°C. Lower phase-Extrakte, Dünnschicht Silica G60, Laufmittel C/M/H 65:25:4; Quantifizierung über Proportionalzähler. D/P = NP40/Protein [$\text{nmol}/\mu\text{g}$]

Nicht nur die Ausbeute an DolPP-GlcNAc₂ ließ sich so um mindestens das Vierfache steigern ($\text{D/P} = 0.99$ verglichen mit $\text{D/P} = 2.9 \text{ nmol}/\mu\text{g}$), gleichzeitig ging der Anteil DolPP-GlcNAc₁ von 42 % bei $\text{D/P} = 0.99$ auf 3 % für $\text{D/P} = 2.9 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ zurück.

Eine analoge Detergensabhängigkeit wurde noch für eine Inkubationszeit von 21 Minuten durchgeführt (nicht gezeigt). Hier war die Ausbeute von DolPP-GlcNAc₂ beim höchsten D/P-Verhältnis von 2.9 bereits wieder geringfügig schlechter als bei 1.98 $\text{nmol}/\mu\text{g}$.

Grund für diesen überraschend positiven Effekt einer gesteigerten Detergensmenge ist sicher einmal eine vollständigere Solubilisierung der beiden Transferasen, zum anderen aber der schon bei Vergleich der Abb. II.1 *oben* mit II.1 *unten* erkennbare Inaktivierungseffekt höherer NP40-Mengen auf die Katalyse des ersten Enzyms (Alg7p = GPT). Die Reaktion zu DolPP-GlcNAc₁ wird dadurch zum Nadelöhr der Reaktionsfolge, so daß praktisch sämtliches entstehende DolPP-GlcNAc₁ sofort von der GNT (die hohe NP40-Mengen gut verträgt, siehe II.3) zum Endprodukt prozessiert wird.

Bei der höchsten Detergensmenge schließlich wird die limitierende erste Reaktion so langsam, daß erst bei 45 Minuten Inkubationszeit das in Abb. II.2 gezeigte Optimum an Ausbeute erreicht wird. Denn in dem unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführten Experiment von nur 21 Minuten Inkubation lag die optimale Detergensmenge bei $\text{D/P} = 1.98 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ – bei $\text{D/P} = 2.9 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ war die Zeit für das Alg7p demnach wohl zu kurz, um bei diesen schon stark inhibierend wirkenden Bedingungen vergleichbar viel DolPP-GlcNAc₁ zu synthetisieren.

Aufgrund der zuletzt erwähnten Beobachtung wurde für das nunmehr standardisierte Protokoll zur DolPP-GlcNAc₂-Synthese aus *gpi1-8*-Solubilisat (siehe A.2.10.4) ein etwas niedrigeres D/P-Verhältnis von 2.5 nmol/ μ g gewählt. Eine Reaktionszeit von 35 Minuten bei 24°C wird um einen Chase mit 83 μ M kaltem UDP-GlcNAc von 10 Minuten auf insgesamt 45 Minuten verlängert. Von der eingesetzten Radioaktivität finden sich nach dieser Methode etwa 55 % in DolPP-GlcNAc₂ wieder – mit DolPP-GlcNAc₁-Mengen, die an der Nachweisgrenze liegen.

II.2 Entwicklung einer Methode zur selektiven und präparativen Dol-PP-GlcNAc₁-Synthese

Da bisher (auch in Hefe) das Gen für die GlcNAc-Transferase **GNT**, welche die Reaktion *DolPP-GlcNAc₁ + UDP-GlcNAc \longrightarrow DolPP-GlcNAc₂ + UDP* katalysiert, noch nicht bekannt ist, bestand die Absicht, das Protein zu reinigen, anzusequenzieren und so Zugang zur Klonierung des entsprechenden Gens zu bekommen. Voraussetzung dafür war aber ein effektives Testsystem mit dem spezifischen Akzeptorsubstrat DolPP-GlcNAc₁. Dieses Substrat war auch nötig, um Fibroblasten aus CDG-Patienten spezifisch auf die Aktivität der zweiten Transferase (GNT) hin zu testen.

In Membranen wie auch im NP40-Solubilisierungssystem (siehe oben) war eine effektive Gewinnung von DolPP-GlcNAc₁ nicht möglich: Bei niedrigen NP40-Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten war zwar DolPP-GlcNAc₁ gegenüber DolPP-GlcNAc₂ auf ca. 1 3/4 angereichert, jedoch bei äußerst niedrigen Gesamtausbeuten. Auch der Versuch, durch Reduzierung der Magnesiumkonzentration, des für beide Reaktionen nötigen Kofaktors, eventuell die zweite Transferase stärker zu treffen, schlug fehl.

II.2.1 Inhibition der GlcNAc-Transferase (GNT) durch UDP

Untersuchungen von Sharma *et al.* [109] zufolge ist der Transfer des zweiten GlcNAc-Restes besonders stark durch UDP zu hemmen, das ja entsprechend der Reaktion *UDP-GlcNAc + DolPP-GlcNAc₁ \longrightarrow Dol-PP-GlcNAc₂ + UDP* frei wird. 0.1 mM UDP hatte bei diesem Enzym eine Inhibition von 62 % zur Folge.

Die GlcNAcP-Transferase hingegen (Alg7p/GPT), die die Reaktion *UDP-GlcNAc + DolP \rightleftharpoons DolPP-GlcNAc₁ + UMP* katalysiert, ist diesen Untersuchungen zufolge bei 1 mM UDP zu nur 45 % zu hemmen, also etwa um den Faktor 14 weniger sensitiv gegenüber UDP. Das sollte zur spezifischen Hemmung des zweiten Enzyms genutzt werden.

Getestet wurden unter Verwendung von NP40-Solubilisat 20, 5 und 2.5 mM UDP in einer 15 Minuten-Inkubation. Eine 5 Minuten-Reaktion ohne UDP diene als Bezugswert. Unter diesen Bedingungen (NP40/P = 1.66 und Inkubationszeit 5 Minuten) war in den oben angesprochenen Vorversuchen noch immer der höchste Anteil an DolPP-GlcNAc₁ zu erzielen gewesen.

In Abb. II.3 sind Kontrolle, die 20 mM und die 2.5 mM UDP-Inkubation zu sehen. In der Kontrollreaktion sind nach 5 Minuten 794 cpm DolPP-GlcNAc₁ entstanden (oben, Peak 2), was knapp 60 % entspricht. Unter UDP-Zugabe wird die erste Transferase (GPT) unerwartet stark inhibiert, während die Aktivität der zweiten Transferase weniger als erwartet durch UDP beeinflusst wird. Bei 20 mM UDP tritt zwar praktisch kein DolPP-GlcNAc₂ mehr auf, das gebildete DolPP-GlcNAc₁ (Mitte) aber ist mit 14 cpm nahe an der Detektionsgrenze. Verringert man nun die Konzentration an UDP, verschiebt sich der Anteil DolPP-GlcNAc₁ schneller zum Schlechteren, als sich die Gesamtmenge steigert. Bereits bei 5 mM UDP (nicht dargestellt) treten wieder knapp 30 %

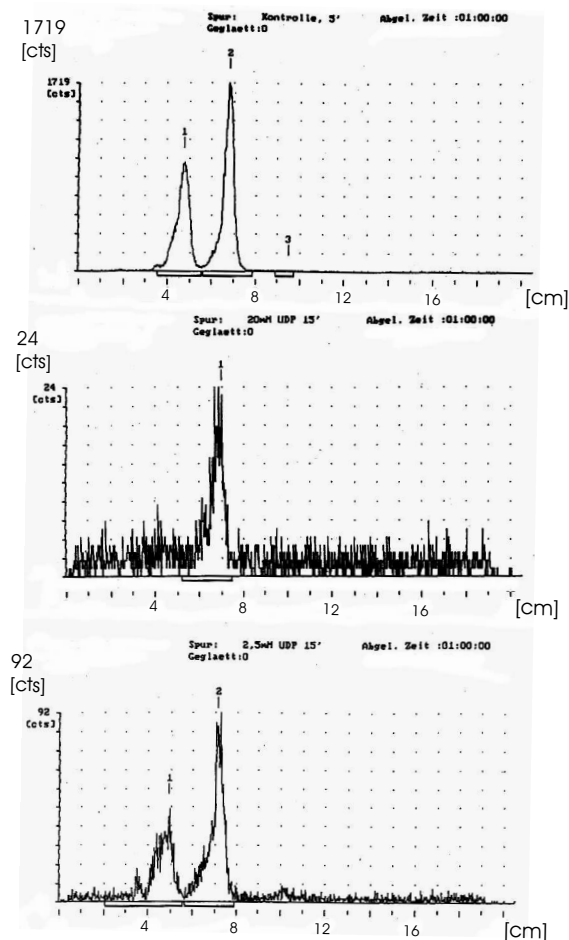


Abbildung II.3: Versuch der gezielten Hemmung der zweiten GlcNAc-Transferase durch UDP
 Der Peak zwischen 4 und 5 cm entspricht DolPP-GlcNAc₂, der Peak zwischen 6 und 7 cm DolPP-GlcNAc₁.
Oben: Kontrollreaktion ohne UDP, 5 Minuten Inkubation 24°C; **Mitte:** 20 mM UDP, 15 Minuten Inkubation 24°C; **unten:** 2.5 mM UDP, 15 Minuten Inkubation 24°C. Je Reaktion 0.05 µCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc, 3.5 µg DolP und 60 µl Solubilisat bei 18 mM MgCl₂ im Endvolumen. „Lower phase“-Extrakte, Dünnschicht Silica G60, Laufmittel C/M/H 65:25:4; Auswertung über Proportionalzählrohr, jew. 1 h gezählt. Solubilisierung: NP40/Protein = 1.66 [nmol/µg]

DolPP-GlcNAc₂ auf, bei 2.5 mM bereits knapp 40 % (unten, Peak 1), obgleich sich die Menge an DolPP-GlcNAc₁ mit 39 bzw. 48 cpm (unten, Peak 2) nur unwesentlich vergrößert. Damit kam diese Strategie zur Erzeugung von DolPP-GlcNAc₁ nicht in Betracht.

II.2.2 Synthese von Dol-PP-GlcNAc₁ über DHPC/Hochsalz-Solubilisierung

Da sich aus Abb. II.1 und II.2 bereits eine relativ starke Detergentsensitivität des Alg7p ableiten läßt, dabei mit weniger Detergens zwar der Anteil an DolPP-GlcNAc₁ zunahm, die Gesamtausbeute aber zurückging, wurde nach neuen Wegen gesucht. Die Idee war, ein möglichst lipidähnliches Detergens zu finden, das wesentlich schonender zu einer effektiven Solubilisierung der ersten Transferase führte. In einem Review berichtet H. Hauser über kurzkettige Diacylphosphatidylcholine als potentielle Detergenzien [30]. Im Gegensatz zu den langkettigen Varianten, die ja die typischen Phospholipide von Biomembranen stellen und – dispergiert in Wasser – präferentiell Bilayer

bilden, ist die bevorzugte Phase der kurzkettigen Phosphatidylcholine (PC) die mizellare. Die solubilisierende Wirkung in Hinsicht auf Membranproteine scheint in erster Linie auf Interaktion mit der Lipiddoppelschicht von Biomembranen zu beruhen. Die Solubilisierungskurven für verschiedene Proteine zeigten sich unabhängig von der Proteinkonzentration, waren jedoch abhängig von der jeweiligen Lipidmenge. So würde die native Lipidumgebung der Membranproteine erhalten, es entstünden gemischte Mizellen aus integralem Membranprotein, intrinsischen Membranlipiden sowie kurzkettigem PC.

Kessi *et al.* [59] hatten bereits erfolgreich Diheptanoylphosphatidylcholin (DHPC) eingesetzt, um verschiedene Membranproteine zu solubilisieren. Die Detergens zu Protein-Verhältnisse betrugen dabei zwischen 1 und 6 nmol/ μ g in Gegenwart von 150 mM NaCl. In einem Fall (Erythrocyten-Membranen) stieg die Ausbeute an solubiliertem Protein wesentlich unter Hochsalzbedingungen (800 mM). Eine hohe Salzkonzentration wirkt sich in zweierlei Hinsicht aus: Einerseits wird die kritische mizellare Konzentration gesenkt, die für DHPC bei 1.4 mM liegt [30, 59]. Andererseits war gezeigt worden, daß hohe Ionenstärke zur Dissoziation des Cytoskeletts aus Erythrocytenmembranen führt [6]. Allgemein jedenfalls werden ionische Wechselwirkungen gebrochen, die möglicherweise auch ER-Membranproteine wie die hier zu solubilisierende GlcNAc-Transferase derart an Strukturelementen verankern, daß eine Solubilisierung bei niedrigen Detergenskonzentrationen nicht oder nur unzureichend gelingt.

Infolgedessen wurde eine Solubilisierungsreihe gestartet, in der systematisch einerseits das DHPC/Protein-Verhältnis, ausgehend von 5.9, bis auf 0.4 gesenkt, andererseits die Salzkonzentration, ausgehend von 150 mM, bis auf 1.5 M gesteigert wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle II.1 zusammengefaßt.

Die Art der Mizellen, die bei der Solubilisierung mit DHPC entstehen, hängt vom Phasenzustand der Membranlipide ab. Kleine, unilamellare Vesikel entstehen beim Mischen von Lipiden in der Gelphase (d. h. auf Eis oder unterhalb der Raumtemperatur), größere unilamellare Vesikel, die oft noch Reste multilamellarer Strukturen aufweisen, beim Mischen mit Lipiden in der flüssig-kristallinen Phase, d. h. oberhalb der Raumtemperatur [30]. Daher wurde für den Wert DHPC/Protein = 1.5 und [NaCl] = 0.5 M eine Solubilisierung mit zweimal 5 Minuten bei 23°C und leichtem Schütteln im Eppendorfinkubator versucht. Die restliche Zeit wurde auf Eis inkubiert (20 Minuten gesamt). Im Unterschied zur in der Tabelle vermerkten Solubilisierung ausschließlich auf Eis war keine Aktivität nachweisbar, dieser Ansatz daher nicht weiter verfolgt worden.

Aus diesen Experimenten lassen sich folgende Tendenzen ablesen:

1. Bei zunehmender Salzkonzentration nimmt die Aktivität der Alg7-Transferase zu.
2. Bei zunehmender Salzkonzentration nimmt die Aktivität der zweiten GlcNAc-Transferase, d. h. der Anteil DolPP-GlcNAc₂, ab.
3. Mit abnehmendem DHPC/Protein-Verhältnis nimmt die Aktivität des ersten Enzyms (Alg7p) zu. Hinsichtlich des zweiten Enzyms ist das Bild uneinheitlich (vgl. prozentualen Anteil DolPP-GlcNAc₁).

Hohe Salzkonzentrationen kommen also der GlcNAcP-Transferase (GPT) entgegen, scheinen dagegen der GlcNAc-Transferase (GNT) abträglich zu sein. Andererseits zeigt sich die GPT auch gegenüber DHPC detergenssensitiv. Die Hochsalzbedingungen mögen nun einerseits dazu führen, bei geringen Detergenskonzentrationen noch eine effektive Solubilisierung zu ermöglichen (Senkung der CMC, Brechen ionischer Wechselwirkungen mit Gerüstelementen), andererseits das Enzym im solubilierten Zustand zu stabilisieren. In Medien hoher Ionenstärke ist bekanntermaßen die hydrophobe Wechselwirkung stark. Einerseits mag dies zur Aufrechterhaltung der nativen

Lipidumgebung beitragen, die gerade bei diesem Enzym sehr wichtig erscheint. Nach den bisherigen Erkenntnissen weist das homologe Hamster-Enzym 10 Membranspannen auf und kann durch Phosphatidylglycerol stabilisiert werden [14, 15]. Für das Hefeenzym wurde von Palamarczyk *et al.* ein effektiver Schutz gegen NP40-Inaktivierung durch Dolicholphosphat (C_{100}) (88 % Restaktivität gegenüber 3 % ohne DolP), dem Lipidsubstrat also, gezeigt [91].

Andererseits zeigen Lehrman *et al.* [15] eine Oligomerisierung des Hamsterenzym, mit funktionellen Konsequenzen: In COS-6 Zellen wird bei gleichzeitig neben dem nativen Gen stattfindender stabiler Expression einer im cytosolischen, katalytisch wichtigen, Loop mutierten Variante (Arg303Lys), die keine Aktivität, jedoch stabile Expression und Faltung aufweist, die endogene Wildtypaktivität inhibiert.

Und weiter schildern Sharma *et al.* für das solubilisierete Hefeenzym eine starke Sensitivität hinsichtlich Verdünnung. Eine 1:4-Verdünnung zog einen Aktivitätsverlust von 65 % nach sich [109]. Dies würde gut ins Bild einer Oligomerenbildung auch für das Hefeenzym passen – unter Detergenseinwirkung und gleichzeitiger Verdünnung käme es zur Monomerisierung und damit zum Aktivitätsverlust. Nun könnte eine Dimerisierung oder Oligomerisierung eines 10-Membranspannen-Enzyms sehr wohl auf hydrophoben Wechselwirkungen der Transmembranspannen-Helices beruhen und wiederum in Medien hoher Ionenstärke stabilisiert werden. Mithin ein weiterer möglicher Grund für die höhere Aktivität bei hohen Salzkonzentrationen.

Bemerkenswert ist weiter, daß zwischen Salz und Salz ein bedeutender Unterschied besteht: Mit 0.5 M KCl konnte – im Gegensatz zu 0.5 M NaCl – keine Enzymaktivität erzielt werden. Da parallel für alle Solubilisierungsversuche in Tab. II.1 auch die OST-Aktivität untersucht wurde, war der gleiche Effekt auch hier zu bestätigen: Mit Standardhexapeptid (4 mM) sowie DolPP- $[^{14}C]GlcNAc_2$ als Minimalsubstrat (4000 cpm) und 10 Minuten Reaktion konnten bei D/P = 1.5 und 0.5 M NaCl 270 cpm Glykopeptid, bei 0.5 M KCl hingegen praktisch kein Umsatz erzielt werden. Doch ist bei einer Nikkol-Solubilisierung Knauer zufolge (und eigene Ergebnisse) 0.5 M KCl erfolgreich [65]. Eine Nikkol-Solubilisierung bei gleichem D/P-Verhältnis (3.1 nmol/ μg) und 1 M NaCl allerdings lieferte nur bescheidene 540 cpm bei 10 Minuten Reaktion und Bedingungen wie oben (eigene Ergebnisse). Daß hier nicht die höhere Salzkonzentration an sich Ursache war, belegt das parallel mit NP40 (D/P = 1.66) und 1.2 M NaCl durchgeführte Experiment: Mit 1600 cpm etwa drei mal so viel Aktivität (für weitere Daten zur OST, siehe I.2).

Ein Solubilisat der OST mit NP40/KCl hingegen war wieder von niedriger Enzymaktivität (25 % Aktivität solubilisiert im Vergleich zu 65 % mit Nikkol unter sonst gleichen Bedingungen [64]).

Das heißt, abhängig vom eingesetzten Detergens scheint die Größe oder Ladungsdichte des vorhandenen Alkali-Ions von entscheidender Bedeutung zu sein. Interessant für die DHPC-Solubilisierung wäre deshalb die Fortführung der Experimente mit dem nächst kleineren Alkali-Ion, also dem Einsatz von LiCl statt NaCl. Entsprechende Experimente fanden noch nicht statt.

Die oben erwähnte Nikkol-Solubilisierung erwies sich für die DolPP-GlcNAc₁-Synthese als völlig ungeeignet: Produkt war ausschließlich DolPP-GlcNAc₂ in geringster Ausbeute (5 cpm). Auch die beschriebene NP40-Solubilisierung – effektiv für die OST – war, wie zu erwarten, ungeeignet: lediglich 52 % DolPP-GlcNAc₁ bei nur 35 cpm. Ergänzend sei hier angemerkt, daß die Ausbeute bei Analyse von Dünnschichtchromatogrammen mit dem Proportionalzählrohr hinsichtlich ^{14}C nur 5-9 % beträgt und über 1 Stunde integriert wurde.

Tabelle II.1: Solubilisierungseffizienz in Abhängigkeit vom DHPC zu Protein-Verhältnis sowie der Salz-Konzentration.

Die Solubilisierungen erfolgten jeweils bei [P] = 6.47 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; je Reaktion (67.2 μl Endvol.) wurde Solubilisat aus 324 μg Membranprotein eingesetzt, 0.05 μCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc sowie 0.052 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DolP. Fett gedruckt sind die Werte aus der dann durchgeführten präparativen DolPP-GlcNAc₁-Synthese (Äquivalent einer Einzelreaktion analysiert). Hier kamen allerdings **0.078 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DolP** zum Einsatz.

Das Abstoppen der Reaktionen, die Aufarbeitung sowie die Dünnschichtchromatographie erfolgten wie unter A.2.11.2 beschrieben. Die DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₁-Fraktion wurde über ein Proportionalzählrohr quantifiziert. Neben DolPP-GlcNAc₁ entstand nur noch DolPP-GlcNAc₂, vgl. Prozentangabe.

	DHPC/Protein [nmol/ μg]	5.9	2	1.56	1.5	1	0.7	0.5	0.45	0.4	0.4
Salz [M]	Reaktionszeit [min]	10	10	10	30	30	30	30	45	30	60
KCl 0.5	DolPP-GlcNAc ₁ [%]				0						
	DolPP-GlcNAc ₁ [cpm]				0						
NaCl 0.15	DolPP-GlcNAc ₁ [%]	0		0							
	DolPP-GlcNAc ₁ [cpm]	0		0							
NaCl 0.5	DolPP-GlcNAc ₁ [%]	0	0	0	85	51					
	DolPP-GlcNAc ₁ [cpm]	0	0	0	11	17					
NaCl 0.8	DolPP-GlcNAc ₁ [%]				79	65	71	81			
	DolPP-GlcNAc ₁ [cpm]				25	95	410	685			
NaCl 1.0	DolPP-GlcNAc ₁ [%]					81	77				
	DolPP-GlcNAc ₁ [cpm]					158	581				
NaCl 1.2	DolPP-GlcNAc ₁ [%]					88		82		87	
	DolPP-GlcNAc ₁ [cpm]					251		915		1039	
NaCl 1.5	DolPP-GlcNAc ₁ [%]							92	87		100
	DolPP-GlcNAc ₁ [cpm]							1105	1280		1001

Die präparative Synthese von DolPP-GlcNAc₁ wurde daher bei DHPC/P = 0.45 und 1.5 M NaCl sowie unter Einsatz der 1.5-fache Menge an DolP (0.078 µg/µl) durchgeführt. Für die experimentellen Details siehe A.2.10.3. Die Analyse eines einer Einzelreaktion entsprechenden Aliquots ist in Abb. II.4 gezeigt.

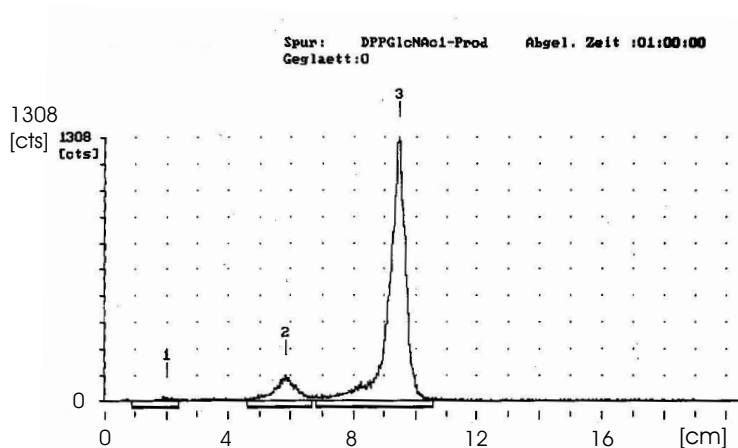


Abbildung II.4: Präparative DolPP-GlcNAc₁-Produktion

45 Minuten Inkubation 24°C; 17.2 µl Prämix (0.05 µCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc sowie 5.25 µg DolP je Reaktion) wurden mit 50 µl Solubilisat zur Reaktion gebracht (für Einzelinkubation – tatsächlich 5x Inkubationen). Analyse eines Lower phase-Volumens entsprechend einer Einzelinkubation: Dünnschicht Silica G60, Laufmittel C/M/H 65:25:4; Auswertung über Proportionalzählrohr, 1 h gezählt. **Solubilisierung:** DHPC/Protein = 0.45 [nmol/µg], [NaCl] = 1.5 M, [P] = 6.48 µg/µl;

Der Peak 3 (zwischen 8 und 10 cm) stellt DolPP-GlcNAc₁ dar, der Peak 2 (zwischen 5 und 6.5 cm) DolPP-GlcNAc₂. Die Gesamtausbeute betrug etwa 15.5 % der in Form von UDP-[¹⁴C]GlcNAc eingesetzten Radioaktivität. Aus Tabelle II.1 läßt sich eine Einordnung in die zuvor durchgeführten Optimierungsexperimente vornehmen. Folgendes ist anzumerken:

- Die Steigerung der DolP-Menge auf das 1.5-fache der sonst üblichen Konzentration, also von 0.052 auf 0.078 µg/µl, brachte praktisch keine Verbesserung. Für künftige präparative Synthesen sollte daher zur geringeren Konzentration zurückgekehrt werden.
- Die bei DHPC/Protein = 0.45 nmol/µg und 1.5 M NaCl geringfügig höhere Ausbeute an DolPP-GlcNAc₁ ist im Vergleich zur 60 Minuten-Inkubation bei gleicher Salzkonzentration und DHPC/Protein = 0.4 nmol/µg mit geringerer Reinheit (86.6 versus 100 %) verbunden. Künftige präparative Synthesen sollten daher besser bei DHPC/Protein = 0.4 und 1.5 M NaCl durchgeführt werden.
- Die 60 Minuten-Inkubation bei D/P = 0.4 nmol/µg und 1.5 M NaCl war wahrscheinlich zu lang. Möglicherweise erfolgte gar schon ein Rückgang der Ausbeute aufgrund von Pyrophosphataseaktivität (vgl. Abb. II.1). Dafür spricht auch der Wert (in cpm) bei D/P = 0.4, 1.2 M NaCl und 30 Minuten: Bei allen Experimenten hatte eine höhere Salzkonzentration bei gleichem D/P-Verhältnis eine deutliche Steigerung der Ausbeute zur Folge. Auch dieser Aspekt legt die Durchführung künftiger präparativer Synthesen unter jenen Parametern, allerdings über nur 40-45 statt 60 Minuten, nahe.

II.3 Optimierung der Solubilisierung der UDP-GlcNAc: GlcNAc₁-PP-Dol GlcNAc-Transferase-Aktivität (GNT) sowie Charakterisierung des Enzyms

Aus Abb. II.1 und II.2 wurde klar, daß mit steigendem NP40/Protein-Verhältnis die Aktivität der GNT immer noch zunahm. Für die DolPP-GlcNAc₂-Synthese konnte die Detergensenmenge nicht über $D/P = 2.5 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ erhöht werden, um noch eine Mindestaktivität der ersten Transferase (GPT) zu bewahren. Um jedoch nun allein die Aktivität der zweiten Transferase zu maximieren, war eine weitere Steigerung des NP40/Protein-Verhältnisses möglich. Eine Solubilisierung bei $D/P = 3.83 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ und $[P] = 6.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ sowie einem pH von 6.6 wies, wie im folgenden zu sehen sein wird, hervorragende Aktivität und Stabilität auf.

II.3.1 Proteinabhängigkeit

Der Proteingehalt von Solubilisat, das wie oben bzw. unter A.2.10.5 beschrieben gewonnen worden war, wurde unter Anwendung des Pierce-Bradford-Reagens (vgl. A.2.4) und Korrektur von Detergenseinflüssen als $4.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestimmt. Von $18.1 \mu\text{g}$ ($3.85 \mu\text{l}$ Solubilisat) bis $91.65 \mu\text{g}$ ($19.5 \mu\text{l}$) Protein auf jew. $60 \mu\text{l}$ Reaktionsvolumen wurde nun bei jeweils 10 Minuten Inkubationszeit die Proteinabhängigkeit der Reaktion untersucht.

Bei Auftrag des Umsatzes pro 10 min Inkubationszeit in % (100 % = vollständiger Umsatz des eingesetzten Substrats zum Produkt) gegen die Proteinkonzentration ergibt sich in Abb. II.5 eine sigmoidale Kurve. Der sigmoidale (Boltzman) Fit ist gestrichelt dargestellt. Damit hängt die Reaktionsgeschwindigkeit nicht linear von der Proteinkonzentration ab. Vielmehr steigt die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit Δv bis etwa $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ an. Von 0.3 bis etwa $0.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ist Δv dann konstant und nimmt anschließend wieder ab.

Der nicht lineare Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigen Proteinkonzentrationen könnte für eine Di- oder Oligomerisierung der Transferase und Kooperativität sprechen. Oder einen stimulierenden Faktor, der erst bei größerer Solubilisatmenge in ausreichender Konzentration vorliegt, um maximal wirksam zu werden.

Der nicht lineare Bereich ab etwa $0.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ dagegen – Δv nimmt wieder ab – ist sicher auf mangelndes Substrat zurückzuführen. Bei $0.46 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ werden bereits 50 % des Substrats innerhalb der Reaktionszeit (10 min) umgesetzt, am Ende des linearen Bereichs ($0.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gar über 80 %, so daß dadurch die beobachtete Kooperativität eher noch unterschätzt werden könnte.

Da diese GlcNAc-Transferase eine der wenigen ER-lokalisierten Glykosyltransferasen darstellt, deren Gene noch völlig unbekannt sind, ist ohne weitergehende umfangreichere Untersuchungen keine sichere Erklärung dieses Phänomens möglich.

II.3.2 Stabilität

Für eine eventuelle Reinigung der GNT war die Stabilität des solubilisierten Enzyms bei 4°C von äußerster Wichtigkeit. Dementsprechend wurde die Transferaseaktivität über drei Tage hinweg getestet, beginnend mit Tag Null. In Abb. II.6 ist die Aktivität in % gegen die Aufbewahrungsdauer bei 4°C aufgetragen.

Im Laufe des ersten Tages war praktisch kein Aktivitätsabfall zu beobachten. Am Tag 2 waren noch immer 97.9 %, am Tag 3 86.2 % Aktivität zu messen. Sehr gute Voraussetzungen also, um eine Reinigung des Enzyms in Angriff zu nehmen.

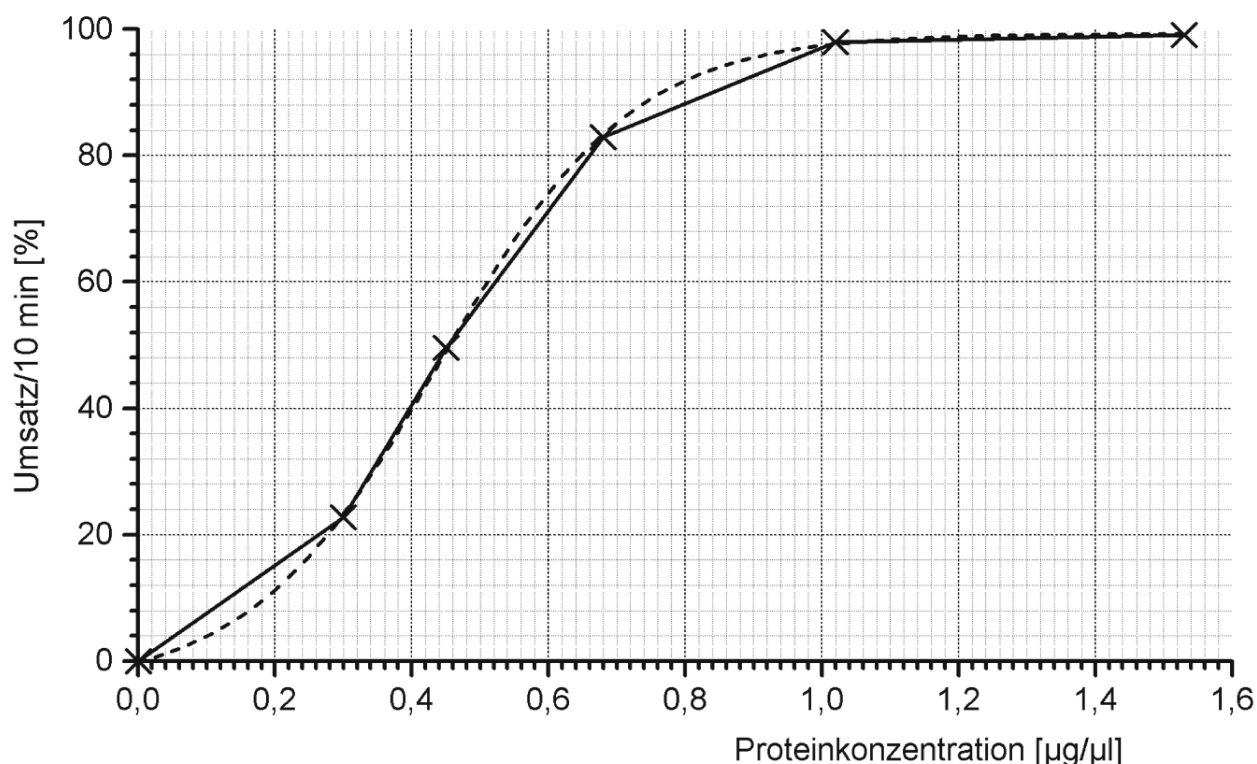


Abbildung II.5: Proteinabhängigkeit der GlcNAc-Transferasereaktion

Solubilisierung: NP40/P = 3.83; [P] = 6.5 µg/µl; **Reaktion:** Die der jeweils angegebenen Proteinkonzentration entsprechende Menge Solubilisat wurde mit 9000 cpm DolPP[¹⁴C]GlcNAc₁, 100 µM UDP-GlcNAc und bei [MgCl₂] = 18 mM 10 Minuten bei 24°C inkubiert. Das jeweilige Endvolumen von 60 µl wurde mit Membranaufnahmepuffer (A.2.1) erreicht. Für weitere Details siehe A.2.10.5.

II.3.3 Weitere Parameter zur GNT-Aktivität

pH-Abhängigkeit Eine detaillierte Untersuchung zur pH-Abhängigkeit wurde noch nicht unternommen. Solubilisat von pH 6.6 (25 mM PIPES) war einmal mit PIPES-Puffer pH 6.6, einmal mit MOPS-Puffer auf die Hälfte verdünnt und so im letzteren Fall auf pH 7.0 gebracht worden. Ein Vergleich der jeweiligen Aktivitäten zeigte einen Rückgang im auf pH 7.0 gepufferten Ansatz um 40 %. Die pH-Präferenz der GNT liegt damit im leicht Sauren. Im folgenden wurde daher das PIPES-System (PK_A = 6.8) mit pH 6.6 beibehalten.

Glycerin Bei einer Verdünnung wie oben beschrieben wurde einmal glycerinhaltiger PIPES-Puffer (35 % Glycerin) verwendet, andererseits eben dieser Puffer ohne Glycerinzusatz. In einer 10 Minuten-Inkubation konnte mit Puffer ohne Glycerin noch 87.5 % der Aktivität des Parallelansatzes erreicht werden. Nach einer 25 h-Lagerung der beiden parallelen Solubilisat-Verdünnungen bei 4°C war der Effekt allerdings drastisch: Ohne Glycerin sackte die Aktivität um 65 % ab. Glycerin ist also für die Langzeitstabilität der Enzympräparation von entscheidender Bedeutung.

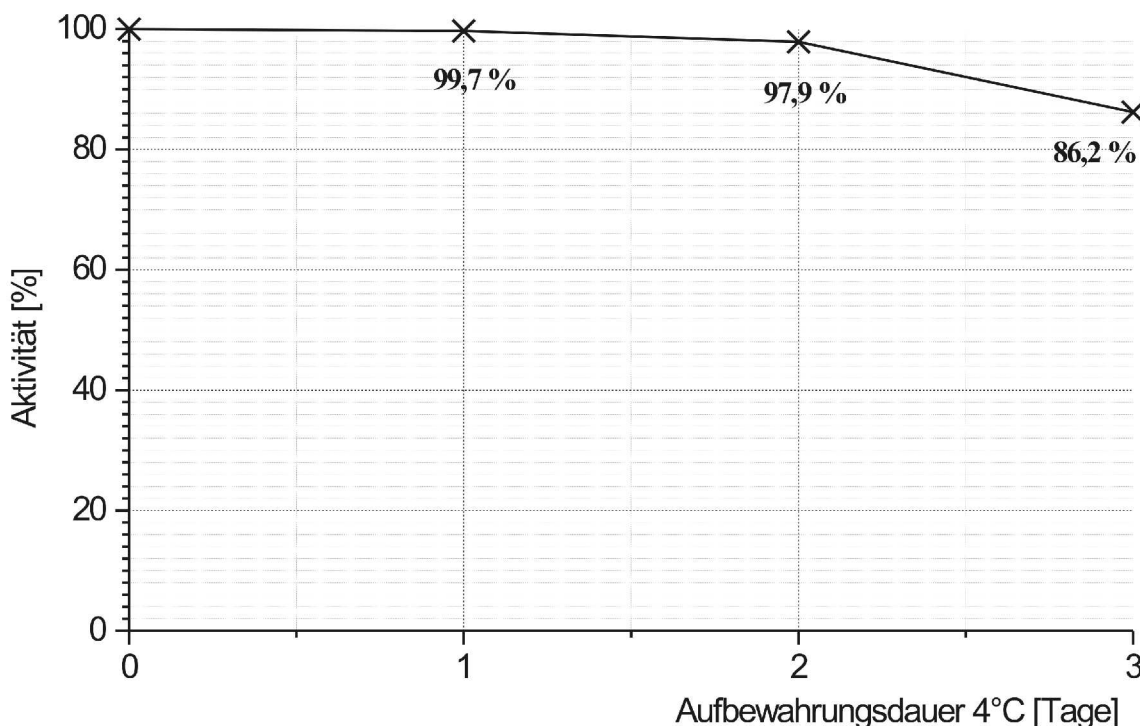


Abbildung II.6: Stabilität der solubilisierten GlcNAc-Transferaseaktivität

Solubilisierung: NP40/P = 3.83; [P] = 6.5 µg/µl; **Reaktion:** 19.5 µl Solubilisat (91.65 µg Protein) wurde mit 9000 cpm DolPP[¹⁴C]GlcNAc₁, 100 µM UDP-GlcNAc und bei [MgCl₂] = 18 mM 10 Minuten bei 24°C inkubiert. Das Endvolumen von 60 µl wurde mit Membranaufnahmepuffer (A.2.1) erreicht. Für weitere Details siehe A.2.10.5.

MgCl₂-Konzentration Was den für dieses Enzym essentiellen Kofaktor Mg²⁺ [109] angeht, ist die Konzentration zwar nicht ausgesprochen kritisch, doch was deutlich über 10 mM hinausgeht, wirkt inhibierend (Abb. II.7): Ähnliche Resultate erhielten Kean und Niu (1998) für das Enzym aus der Retina von Hühnerembryonen [55]. Allerdings sei für dieses Enzym eine Konzentration von 6.7 mM MgCl₂ zwar stimulierend, dagegen nicht essentiell. Im vorliegenden Experiment wurden keine Konzentrationen unter 13.7 mM getestet, da Sharma *et al.* [109] von optimaler Aktivität zwischen 5 und 20 mM berichteten. Insofern ist bezüglich der unbedingten Notwendigkeit von Mg²⁺ als Kofaktor für die GNT der Hefe hier keine unabhängige Aussage möglich. Diesbezüglich könnten sich also das Enzym aus Hefe von dem aus Hühnerembryonen deutlich unterscheiden. Art und Umfang der Hemmung hingegen sind erstaunlich ähnlich. Anders, als in [109] berichtet, wirken sich für das Hefeenzym bereits Konzentrationen über 13.7 mM MgCl₂ (und möglicherweise sogar noch darunter) negativ aus. Setzt man die von Kean *et al.* berichteten Werte in Relation zum dortigen Wert bei 14 mM (als 100 %), so werden für 20 mM MgCl₂ noch 85 % (hier 83 %), für 26 mM 75 % (hier 77 %) und für 36 mM noch 59 % (hier 60 %) Restaktivität gemessen. In diesem Punkt scheinen sich die beiden Enzyme also sehr ähnlich zu sein.

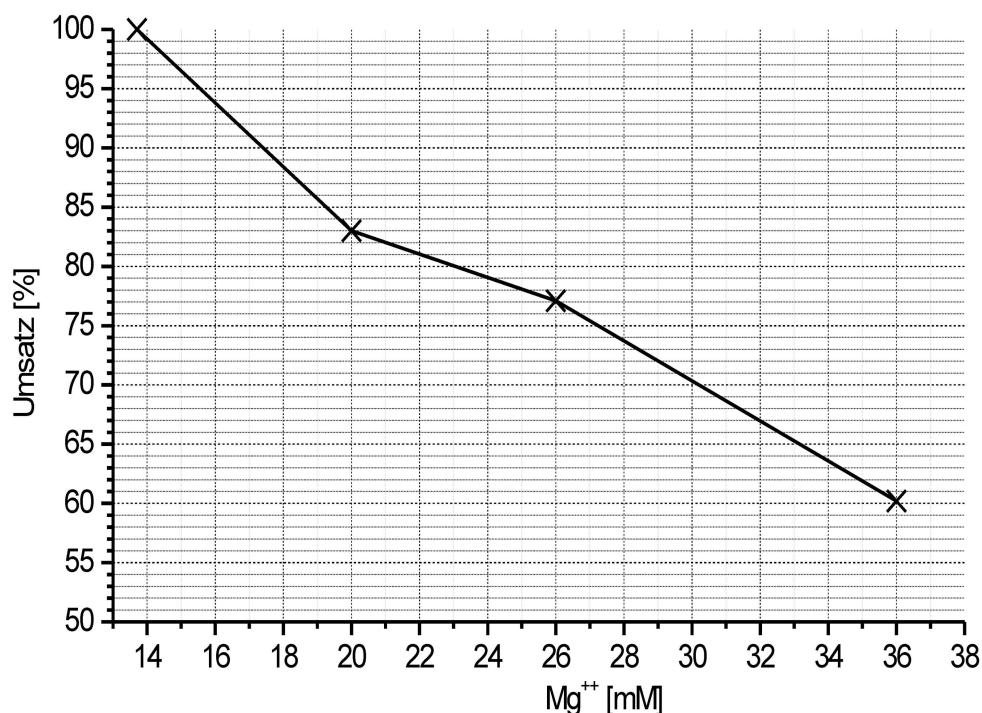


Abbildung II.7: Inhibierung der GlcNAc-Transferase durch hohe Mg^{2+} -Konzentrationen

Solubilisierung: NP40/P = 3.83; [P] = $6.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; **Reaktion:** $7.5 \mu\text{l}$ Solubilisat ($35.25 \mu\text{g}$ Protein) wurde mit 3150 cpm DolPP-[^{14}C]GlcNAc₁, $2 \mu\text{M}$ UDP-GlcNAc, $0.83 \mu\text{M}$ UDP-[^3H]GlcNAc ($0.6 \mu\text{Ci}$) mit jeweils 27 % Glycerin im Reaktionsvolumen bei den angegebenen $MgCl_2$ -Konzentrationen 5 Minuten bei 24°C umgesetzt. Die **Aufarbeitung** erfolgte wie unter A.2.10.5 beschrieben, nur daß hier die „lower phase“ in Szintillationsgläsern vollständig eingeblasen, mit Szintillationscocktail in Lösung gebracht und im Szintillationszähler das [^3H]-Fenster (umgesetztes Substrat) in Verhältnis zum [^{14}C]-Fenster gesetzt und relativ zu einer Nullkontrolle der Umsatz bewertet wurde.

II.4 Entwicklung von *in vitro*-Verfahren für die Mannosylierung von DolPP-GlcNAc₂

Versuche, mit Hefemembranen exogen zugeführtes DolPP-[^{14}C]GlcNAc₂ mit GDP-Man zu verlängern, schlugen fehl. Dennoch soll hier kurz zusammengefaßt werden, was versucht wurde: Zunächst wurde DolPP-GlcNAc₂ in Form eines NP40-haltigen Prämixes mit Membranen gemischt und mit GDP-Man versetzt – ohne wesentlichen Umsatz.

Um eine mögliche Hemmung der Aktivität durch Detergens zu vermeiden und dennoch zu einer Integration des Oligosaccharidlipids in Mikrosomen zu gelangen, wurde in C/M 1:1 gelöstes DolPP-GlcNAc₂ mit N_2 eingeblasen, in Reaktionspuffer durch Beschallung dispergiert, Membranen zugegeben, erneut kurz beschallt und mit GDP-Man gemischt. Dieser und ähnliche Beschallungsansätze in Gegenwart geringer Mengen Detergens (NP40 oder DHPC) zeigten jedoch keine Enzymaktivität.

Da DolPP-GlcNAc₂Man₅ und auch länger-kettige Oligosaccharidlipide, in Lösung gebracht mit NP40, problemlos in Hefe-Membranen verlängert werden können, allerdings mit Phosphatidylcholin im Ansatz, wurde versucht in Gegenwart dieses Phospholipids (1.13 mM PC) einen Umsatz von DolPP-GlcNAc₂ zu erreichen, jedoch ohne Erfolg.

Ähnliche Versuche, DolPP-GlcNAc₁ mit Hefemembranen *in vitro* zu verlängern, waren schon früher gescheitert: Unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen fand nur in solubilisiertem Enzym ein Umsatz statt. Im Weiteren wurde deshalb an geeigneten Solubilisierungsmethoden gearbeitet.

II.4.1 DHPC-Solubilisierung und DolPP-GlcNAc₂Man₁-Produktion

Hier kam zunächst das als besonders mildes Detergens wirkende, kurzkettige Phospholipid Diheptanoylphosphatidylcholin (DHPC) zum Einsatz, das sich schon bei der Solubilisierung des *S. cerevisiae* Alg7p bewährt hatte (II.2.2). Jeweils 145 µg Protein wurden in 20 mM PIPES pH 6.6, 16 mM MgCl₂ und ca. 16 % Glycerin bei alternativ 150 mM bzw. 800 mM NaCl sowie drei verschiedenen DHPC-Mengen (D/P = 0.45, 0.9, 1.35 nmol/µg) bei [P] = 2.4 µg/µl solubilisiert. 3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂ (aus C/M 1:1 eingeblasen) wurden mit der Gesamtsolubilisationsmenge in Lösung gebracht und die Reaktion mit 5.3 mM GDP-Man gestartet und 30 Minuten bei 24°C inkubiert. Reaktionsstopp und Aufarbeitung fanden statt wie unter A.2.10.6 beschrieben.

In allen Ansätzen kam es zu einer Verlängerung, wenn auch unterschiedlich effektiv, (Abb. II.8). Das Substrat, DolPP-GlcNAc₂, liegt als Doppelbande vor, was auf unterschiedliche Dolichol-Längen zurückzuführen ist. Offensichtlich spielt beim Laufverhalten des Disaccharidlipids die Länge des Dol-Rests noch eine große Rolle. Ab dem Trisaccharid bestimmt dann in erster Linie die Oligosaccharidgruppe das Laufverhalten auf der polaren Kieselgelmatrix, so daß meist eine Einzelbande auftritt. Nach mildsaurer Hydrolyse von DolPP-GlcNAc₂ wandert das freie Disaccharid als homogene Bande (vgl. auch Abb. II.9).

Aufgrund des Abstands zur DolPP-GlcNAc₂-Doppelbande wurde in der neu aufgetretenen Bande DolPP-GlcNAc₂Man₁ (LLOMan₁) vermutet.

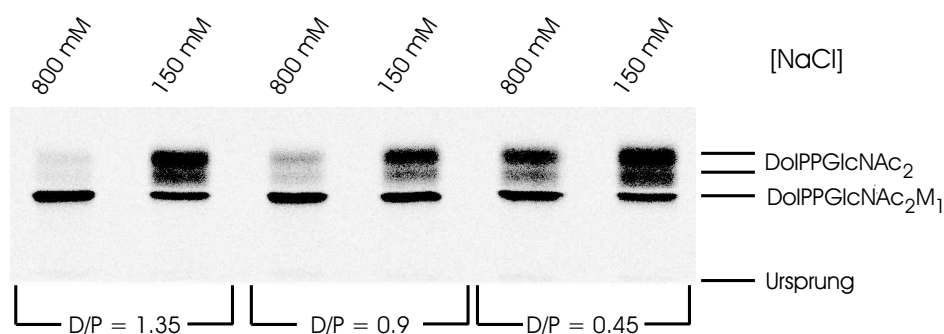


Abbildung II.8: Optimierung der DolPP-GlcNAc₂-Man₁-Gewinnung aus Hefe-DHPC/NaCl-Solubilisat

„Lower phase“-Extrakte, Dünnschichtchromatographie: Laufmittel C/M/H 65:25:4

Die optimalen Solubilisierungsparameter waren also DHPC/P = 1.35 nmol/µg und 800 mM NaCl. Auf diese Weise wurde im Folgenden eine präparative Synthese durchgeführt. Nach Abstoppen der Reaktionen mit C/M 3:2 erfolgte hier eine getrennte Aufarbeitung von „lower phase“ (nach A.2.10.6) und Interphase/Protein (10:10:3-Extraktion nach A.2.11.9), um eventuell entstehende länger-kettige Lipidoligosaccharide mit zu erfassen. Über Szintillationszählung wurde eine Verteilung der Radioaktivität mit ca. 81 % auf die „lower phase“ und etwa 19 % auf den 10:10:3-Extrakt ermittelt. Nach mildsaurer Hydrolyse erfolgte die Produktanalyse durch Dünnschichtchromatographie (nicht gezeigt). Im Gesamtansatz („lower phase“ + 10:10:3-Extrakt) sind demnach etwa 25

% DolPP-GlcNAc₂Man₂₋₅ enthalten, und zwar fast zur Gänze im 10:10:3-Extrakt. Bezüglich der „lower phase“ deutete alles auf DolPP-GlcNAc₂Man₁ als die Identität des Produkts hin.

Nun stand genügend Material zur Verfügung, um sowohl die Identität des Produkts abzusichern, als auch schon erste Experimente anzustellen. Da allerdings später ein noch effektiveres Verfahren zur Herstellung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ gefunden worden war (vgl. II.4.2.1), kam das hier beschriebene nicht mehr zur Anwendung.

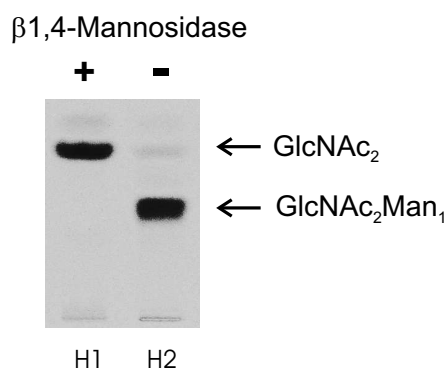


Abbildung II.9: Produktcharakterisierung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ durch eine β1,4-spezifische Mannosidase aus *Helix pomatia*:

Verdau von freiem Oligosaccharid nach mildsaurer Hydrolyse. H1 = Oligosaccharid mannosidasebehandelt; H2 = unbehandelte Kontrollinkubation. TLC Silica G60, Aceton/n-Butanol/H₂O 70/15/15, zweimal entwickelt.

Um endgültig die Identität des erhaltenen „lower phase“-Produktes zu klären, erfolgte ein enzymatischer Verdau präsumptiven Manβ1,4GlcNAc₂-PPDol mit *Helix pomatia* β1,4-Mannosidase (Glyko, UK). Zwei Verfahren wurden getestet:

Einmal wurde versucht, dolicholgebundenes Oligosaccharid ohne vorherige Trennung vom Dolicholrest umzusetzen. Dazu wurden 6000 cpm des Produkts mit etwas NP40 im Inkubationspuffer (Citrat/Phosphatpuffer pH 4.0) durch Beschallung in Lösung gebracht und mit 0.02 U Enzym/μl in einem Endvolumen von 30 μl 16 h bei 37°C verdaut.

Zum andren erfolgte nach mildsaurer Hydrolyse der Verdau des freien Oligosaccharids. Dafür wurden 9000 cpm [¹⁴C]Oligosaccharid geteilt: Die eine Hälfte wurde im Reaktionspuffer mit 0.004 U Enzym/μl in einem Endvolumen von 20 μl bei 37°C 16 h verdaut. Die andere Hälfte diente unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Mannosidase, als Kontrollinkubation.

Für weitere experimentelle Details zu beiden Verfahren sowie die jeweilige Aufarbeitung siehe A.2.8.4.

Beide Ansätze wurden über Dünnschicht analysiert und waren erfolgreich. Der Verdau des freien Oligosaccharids ver-

lief sogar quantitativ, wie aus Abb. II.9 ersichtlich (Spur H1). Auch das an Dolichol gebundene Oligosaccharid diente der β-Mannosidase als Substrat (Daten nicht gezeigt), wobei allerdings noch eine Restmenge an unverdaulichem Edukt zurück blieb. Die Identität des hergestellten DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrats mit Manβ1,4GlcNAc₂-PP-Dol war damit eindeutig bestätigt.

II.4.2 Versuche der Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂ bzw. DolPP-GlcNAc₂-Man₁

Nun fanden Versuche statt, eine Verlängerung exogen zugefügten LLO-Substrats (DolPP-GlcNAc₂ bzw. DolPP-GlcNAc₂Man₁) über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus zu erreichen. Solubilisierungsstrategien wurden dabei angelehnt an Veröffentlichungen von Jensen und Schutzbach (1980, 1981 und 1982) [47–49, 104] (siehe auch III.3.2) entwickelt, die bereits verschiedene Mannosyltransferaseaktivitäten erfolgreich aus Schweine- bzw. Kaninchen-Leber solubilisiert hatten. Doch im Unterschied zu Fibroblasten (vgl. III.3.2) konnte so keine *in vitro*-Aktivität erreicht werden.

Andererseits berichteten Belard *et al.* (1988) [5] von einer Oligosaccharid-PP-Dol spezifischen Pyrophosphatase-Aktivität in Triton X-100 Hefe-Microsomensolubilisat, die durch Bacitracin hemmbar war. Da es denkbar erschien, daß aufgrund einer solchen Aktivität im NP40-Solubilisat

(NP40 unterscheidet sich von Triton X-100 nur um weniger als eine Ethoxy-Gruppe) Hydrolyse verlängerten Oligosaccharidlipids stattfinden und somit bei der Phasentrennung mit der upper phase verloren gehen könnte, wurden Experimente mit NP40-Solubilisat (NP40/Protein = 0.35 nmol/ μ g), NP40 und 10 mM Bacitracin sowie ausschließlich mit 10 mM Bacitracin (hat Detergenswirkung) unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Ergebnisse von Jensen/Schutzbach durchgeführt. LLO-Edukt war dabei DolPP-GlcNAc₂Man₁.

In allen drei Experimenten war der Umsatz zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ < 10 %. Desweiteren war nach Szintillationszählung der jeweils gesammelten upper phases (in denen ja durch Pyrophosphatase von DolP abgespaltenes, freies Oligosaccharid zu erwarten wäre) klar, daß hier kein wesentlicher Unterschied zwischen Ansätzen mit und ohne Bacitracin bestand. Die beschriebene Pyrophosphataseaktivität dürfte somit keine Rolle spielen.

II.4.2.1 Effiziente Synthese von DolPP-GlcNAc₂Man₁ in GNT-Solubilisat

Wie sich zeigte, konnte im Solubilisat, das die GlcNAc-Transferase-Aktivität angereichert enthielt (NP40/P = 3.83, A.2.10.5), nicht nur DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₁ in Gegenwart von kaltem UDP-GlcNAc zu DolPP-GlcNAc₂, sondern bei gleichzeitiger Anwesenheit von 3 mM GDP-Man auch eine sehr effiziente, quantitative Verlängerung zu DolPP-GlcNAc₂Man₁ und darüber hinaus erreicht werden:

- In der „lower phase“ war als einziges Produkt DolPP-GlcNAc₂Man₁ zu finden, entsprechend etwa 75 % des eingesetzten radioaktiven Substrats.
- Im 10:10:3-Extrakt waren immerhin ca. 10 % der Ausgangsradioaktivität (960 cpm) zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ verlängert worden, etwa 8 % (660 cpm) lagen als Intermediate zwischen DolPP-GlcNAc₂Man₁ und DolPP-GlcNAc₂Man₅ vor.

Damit also schien das GNT-Solubilisat hervorragend geeignet zur DolPP-GlcNAc₂Man₁-Gewinnung. Daneben stimmten die etwa 18 % Verlängerung über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus hoffnungsvoll: Bei Verzicht auf möglicherweise die α 1,3-Transferase hemmendes Glycerin (7.5 % Glycerin im Reaktionsvolumen, vgl. III.3.2) wäre dies eventuell noch zu steigern.

Im Folgenden fand, ausgehend von DolPP-GlcNAc₂, eine präparative DolPP-GlcNAc₂Man₁-Synthese (wie unter A.2.10.6 beschrieben) unter Verwendung des GNT-Solubilisats und zusätzlichen Glycerins (12.4 % Endkonzentration) statt, um gezielt eine Verlängerung über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus zu verhindern. Im Unterschied zu oben wurden nur 1.5 mM GDP-Man eingesetzt. In der Tat waren praktisch keine längerkettigen Nebenprodukte mehr entstanden und ein vollständiger Umsatz zu DolPP-GlcNAc₂Man₁ erfolgt. Mit 88 % Rückgewinnung der eingesetzten Radioaktivität als Produkt trat nahezu kein Substanzverlust auf. Diese Art der DolPP-GlcNAc₂Man₁-Gewinnung wurde damit fortan als Standardverfahren beibehalten (vgl. A.2.10.6).

II.4.2.2 Entwicklung einer „Synthetischen Upper phase“ für das CHCl₃/CH₃OH/H₂O 2:1:1-System (UP 2:1:1)

Ein weiteres denkbare Problem bei der Verlängerung mit GDP-Man über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus war die mit zunehmender Oligosaccharidlänge von DolPP-GlcNAc₂Man_x steigende Hydrophilie und damit die Gefahr, über Waschungen mit synthetischer „upper phase“ die längsten LLO-Fractionen am stärksten abzureichern. Die übliche synthetische „upper phase“ (CHCl₃/CH₃OH/

H₂O 3:48:48) war konzipiert für das CHCl₃/CH₃OH/H₂O 3:2:1-System (UP 3:2:1, nach [25]). Für die längerkettigen LLOs kam aber das 2:1:1-System zur Anwendung: Ein steileres Gefälle von unpolarer „lower phase“ zu polarer „upper phase“ soll die amphiphilen längerkettigen Oligosaccharidlipide stärker an der Phasengrenze konzentrieren. Diesen Effekt würde aber die „falsche“, zu unpolare synthetische „upper phase“ wieder teilweise zunichte machen. Deshalb erfolgte die Konzeption einer neuartigen synthetischen „upper phase“ speziell für das 2:1:1-System. Dabei wurde von den folgenden Überlegungen ausgegangen:

1. Chloroform und Wasser sind praktisch nicht miteinander mischbar, Methanol löst sich dagegen unbegrenzt in beiden. Folglich wird sich Methanol als dritte Komponente, abhängig vom Volumenverhältnis der Chloroform- zu Wasserphase und der jeweils frei werdenden Mischungsenthalpie, zwischen beiden Phasen verteilen (für Methanolanteile die hinreichend klein sind, so daß keine Phasenhomogenität eintritt).
2. Da keine protokollierten Meßgrößen für diese Lösungsmittelsysteme zu finden waren, wurde prinzipiell postuliert, daß sich im 3:2:1-System eine Oberphase der Zusammensetzung C/M/H 3:48:48 einstellt (also der Zusammensetzung der synthetischen „upper phase“ für dieses System nach [25]) und daraus, zusammen mit dem ersten Postulat, die Verteilungsparameter für Methanol zwischen Chloroform und Wasserphase verallgemeinert: Bei Normierung des H₂O-Anteils auf 1 würde sich damit je Anteil Chloroform 1/6 des jeweils vorhandenen Methanols in der Chloroformphase lösen. Im 2:1:1-System würde demnach etwa 1/3 des Methanolanteils zusammen mit den 2 Teilen Chloroform die „lower phase“ bilden, 2/3 würden mit 1 Teil Wasser die „upper phase“ konstituieren. Bei 48 Teilen H₂O also 32 Teile Methanol.
3. Die Beobachtung aus dem C/M/H 3:2:1-System unter Anwendung der synthetischen „upper phase“ 3:48:48 war allerdings, daß mit jeder Waschung sich das Volumen der „lower phase“ reduzierte. Folglich war die synthetische „upper phase“ für dieses System ungenügend gesättigt mit Chloroform, der Chloroformanteil also nicht der Wirklichkeit entsprechend. Deshalb wurde dieser Anteil für die „neue“ „upper phase“ knapp unter der Sättigungsgrenze gewählt.

Die so abgeleitete synthetische „upper phase“ für das C/M/H 2:1:1-System (UP 2:1:1) weist ein Verhältnis von CHCl₃/CH₃OH/H₂O 0.992:32:48 auf. Damit ist der Wasser-Anteil erheblich größer, der Methanol-Anteil entsprechend kleiner als in UP 3:2:1 und der Chloroform-Anteil an der Sättigungsgrenze. Folgerichtig bleibt nun auch bei wiederholten Waschungen mit UP 2:1:1 das Volumen der „lower phase“ unverändert.

Um nun die einerseits postulierte verbesserte Retention langkettiger LLOs sowie die andererseits erwartete effektivere Abreicherung von nicht umgesetzten Zuckernukleotiden bzw. Zuckermonomeren zu validieren, fand eine Erprobung mit einer aus metabolischer Markierung mit [³H]Mannose gewonnenen [³H]-LLO Fraktion (überwiegend DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃) statt, die eine relativ große Menge [³H]Mannose enthält. Dabei wurde einerseits eine effektive Abtrennung des Zuckermonomers (2:1:1-Verteilung und 2x Waschung mit UP 2:1:1) von 45 % auf etwa 10 % erreicht, andererseits hielt sich der Verlust an lipidgebundenem Oligosaccharid mit etwa 5 % stark in Grenzen. Der LLO-Verlust beim bisherigen Verfahren war wesentlich größer und betrug ca. 30 %.

Daher kam im Folgenden bei Verteilungen nach 2:1:1 stets UP 2:1:1 zur Anwendung.

II.4.2.3 Zusammenfassung weiterer Solubilisierungsversuche und Schlußfolgerungen für künftige Experimente

Systematische Steigerung des NP40/Protein-Verhältnisses Nachdem die NP40-Solubilisierung, angelehnt an die Bedingungen bei Jensen und Schutzbach, keine befriedigenden Ergebnisse gebracht hatte (vgl. II.4.2), wurde, ausgehend vom NP40/P-Verhältnis 2.3 (wie es für Fibroblasten etabliert worden war, vgl. III.3), die Detergensmenge über 2.5 und 2.9 bis zu 3.5 nmol/ μ g gesteigert. Dabei wurde wieder ohne Glycerin gearbeitet und methodisch wie unter A.2.11.7 verfahren. Es fand jedoch im Falle von DolPP-GlcNAc₂Man₁ als Substrat keine Verlängerung statt, im Falle von DolPP-GlcNAc₂ nur bis DolPP-GlcNAc₂Man₁. Damit scheint das Spektrum möglicher Detergensmengen für NP40 weitgehend abgedeckt, dieses Detergens zur Solubilisierung der Mannosyltransferaseaktivitäten DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ in Hefe also womöglich wenig geeignet.

Möglicher Einfluß der Wachstumsphase Bei Hefe könnte die Wachstumsphase bei der Zellernnte für die erfolgreiche Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ eine Rolle spielen. Bei Standardmembranpräparationen wurde bei etwa OD₆₀₀ von 8 geerntet. Infolgedessen erfolgte ein erneuter Versuch mit *alg3*-Membranen, die bei der Ernte eine OD₆₀₀ von 2 hatten. Dabei wurde

1. eine Solubilisierung mit NP40 wie im Falle von Fibroblasten (D/P = 2.32 nmol/ μ g, A.2.11.7) sowie
2. eine Solubilisierung mit DHPC/NaCl wie für Fibroblasten im Experiment III.3.2 (D/P = 1.35 nmol/ μ g; 0.8 M NaCl) beschrieben

durchgeführt. Jeweils wurden 297.5 μ g Membranprotein solubilisiert und im Test die Gesamtmenge an Solubilisat (ca. 40 μ l) eingesetzt. Als LLO-Substrat dienten 3000 cpm DolPP-GlcNAc₂. Im Nachhinein betrachtet hätte besser DolPP-GlcNAc₂Man₁ verwendet werden sollen, da augenscheinlich die Optima für die β 1,4-Mannosyltransferase einerseits und die der α -Mannosyltransferasen DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ andere sind. Deshalb nun die Aufschlüsselung in einerseits % Radioaktivität, die zu DolPP-GlcNAc₂Man₁₋₅ umgesetzt wurden, und andererseits (mit dem Anteil DolPP-GlcNAc₂Man₁₋₅ = 100 %) in % Radioaktivität, die zu DolPP-GlcNAc₂Man₂₋₅ umgesetzt wurden. Inkubiert wurde 20 Minuten bei 26°C.

Tabelle II.2: NP40-Solubilisierung versus DHPC/NaCl von Hefemembranen (jeweils ohne Glycerin): Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂ mit GDP-Man und Vergleich des Umfangs der über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus verlängerten Oligosaccharidlipide

	NP40 D/P = 2.32	DHPC D/P = 1.35; 0.8 M NaCl
% DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁₋₅	86.3	31.4
% DolPP-GlcNAc ₂ Man ₂₋₅ (für DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁₋₅ = 100 %)	3.5	29.3

Die NP40-Solubilisierung ist also, wie bereits oben beschrieben, sehr gut zur Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₂Man₁ geeignet. Dagegen scheint DHPC für die folgenden α -Mannosyltransferasen geeigneter zu sein. Ob dabei NaCl in dieser hohen Konzentration wirklich

förderlich ist, muß noch ermittelt werden.

In jedem Fall scheint die Wachstumsphase der Hefezellen für die DolPP-GlcNAc₂Man₁-Verlängerung nicht von wesentlicher Bedeutung zu sein.

Möglicher Einfluß der Membranpräparation Der zur Membranpräparation in Hefe standardmäßig eingesetzte Glasperlenaufschluß könnte negative Auswirkungen auf die Stabilität der untersuchten Mannosyltransferasen haben. Deshalb wurden Membranen über Spheroblastierung (A.2.2.2) gewonnen und anschließend solubilisiert sowie experimentell verfahren nach der bei Fibroblasten erarbeiteten Standardmethode (A.2.11.7). Davon abweichend betrug die Inkubationstemperatur 25°C. Neben dem Hefe-Ansatz, der 20 Minuten inkubiert wurde, fand noch eine 15 Minuten Kontrollinkubation mit Fibroblasten-Solubilisat statt. Das Akzeptorsubstrat war jeweils DolPP-GlcNAc₂Man₁.

Nur das Fibroblasten-Kontrollexperiment mit Verlängerung bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ war erfolgreich. Im Hefe-Solubilisat dagegen kam es zu keinerlei Verlängerung (Daten nicht gezeigt). Damit kann die Art der Membranpräparation nicht ursächlich sein für das Ausbleiben der Elongation in Hefe.

Vorschläge für künftige Experimente, um in Hefe DolPP-GlcNAc₂Man₁ zu verlängern: Sowohl bei Fibroblasten (III.3.2) als auch bei Hefe (siehe oben) wurde also die Solubilisierung mit DHPC/Protein = 1.35 nmol/µg, 0.8 M NaCl sowie pH 7.1 - 7.2 erprobt. Zwar wurden in Fibroblasten unter diesen Bedingungen nur 56 % des eingesetzten DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrates umgesetzt, doch war in Hefe diese Art der Solubilisierung die bislang erfolgreichste (vgl. Tab. II.2). Womöglich sollte jedoch auf NaCl verzichtet und dafür das bei Fibroblasten für NP40 ermittelte D/P-Verhältnis von 2.3 nmol/µg getestet werden.

Da von einem hemmenden Einfluß von Glycerin auf die α1,3-Mannosyltransferase auszugehen war (vgl. III.3.2) und daher auf eine Anwendung verzichtet wurde, fehlte damit dessen stabilisierende Wirkung. Ein Ersatz durch 500 mM Saccharose könnte sich insofern günstig auswirken. Saccharose hemmt zumindest im Fibroblastensolubilisat keine der Transferasen (III.3.2).

Andererseits stellt sich die Frage des pH-Optimums: Denn obwohl im initialen Experiment zur Verlängerung von DolPP-GlcNAc₁ in GNT-Solubilisat immerhin etwa 18 % des eingesetzten DolPP-GlcNAc₁-Substrats über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus verlängert werden konnten (D/P = 3.83 nmol/µg zur Solubilisierung, 7.5 % Glycerin im Reaktionsvolumen, pH 6.6; vgl. II.4.2.1), fand im oben geschilderten Experiment bei einem ganz ähnlichen NP40/P-Verhältnis (3.5 nmol/µg) ohne Glycerin und bei pH 7.2 (Tris-Puffer wie im erfolgreichen Test für Fibroblasten) keine Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂ über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus statt. Selbst die Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₂Man₁ verlief nicht ganz quantitativ. Entweder ist für die Hefetransferasen eine Glycerin äquivalente Stabilisierung beispielsweise mit Saccharose erforderlich, oder aber das pH-Optimum womöglich aller Mannosyltransferasen ins Saure (pH 6.6 - 6.65) verschoben. Folgende Experimente erscheinen mir daher zunächst sinnvoll, um günstige „Stellparameter“ zu ermitteln (alle mit 300 µg Protein zur Solubilisierung, [P]_{Solubilisierung} = 7 µg/µl; in Reaktion 3000 cpm DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrat, Solubilisat quantitativ, 10 mM MgCl₂, 24°C 30 Minuten):

- DHPC/P = 1.35 nmol/µg, 0.8 M NaCl, pH 7.1 - 7.2 als Referenz;
- DHPC/P = 1.35 nmol/µg, 0.8 M NaCl, pH 6.6;

- DHPC/P = 2.3 nmol/ μ g, pH 7.1 - 7.2;
- DHPC/P = 2.3 nmol/ μ g, 500 mM Saccharose, pH 7.1 - 7.2;
- NP40/P = 3.83 nmol/ μ g, 500 mM Saccharose, pH 6.6;

Die Solubilisierungsprozedur, der DolPP-GlcNAc₂Man₁-PM sowie die Aufarbeitung könnte dabei nach den für Fibroblasten ermittelten Methoden erfolgen (A.2.11.7).

Kapitel III

Synthese von Lipid gebundenen Oligosacchariden in humanen Fibroblasten und „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG)

III.1 Aufbau eines Tests für die humane GPT-Transferase (Alg7p_{hum}) aus Fibroblastenmembranen

Um im Rahmen der Aufklärung von Glykosylierungsstörungen beim Menschen (CDG-Syndrom) für die ER-lokalisierten Glykosylierungsreaktionen Testsysteme zu entwickeln, war auch der selektive Test des humanen Homologs zum *S. cerevisiae* Alg7p (UDP-GlcNAc:Dolichylphosphat *N*-Acetylglucosamin 1-Phosphat Transferase = **GPT**) von hoher Wichtigkeit. Bisher erfolgte dieser Test in Rohmembranen, zwangsläufig gekoppelt mit der weiteren Verlängerung des Reaktionsprodukts von Alg7p_{hum} durch die folgende GlcNAc-Transferase, teilweise auch noch durch die sich anschließende β 1,4-Mannosyltransferase. Für deren Aktivität war das wenige, bei der Membranpräparation nicht völlig ausgewaschene endogene GDP-Man ausreichend. Da aber gerade die frühen Schritte der LLO-Synthese hoch komplex durch Rückkoppelungsmechanismen reguliert zu sein scheinen [56, 79] und damit eine Beeinflussung der untersuchten Reaktion durch in unterschiedlichen Ausmaßen entstehende Folgeprodukte (DolPP-GlcNAc₂ sowie DolPP-GlcNAc₂Man₁) nicht auszuschließen war, schien eine gezielte Analyse der Alg7p_{hum}-Aktivität unter Unterbindung jeglicher Folgereaktionen von entscheidender Bedeutung. Da in *S. cerevisiae* ein entsprechender Ansatz zur biochemischen Synthese von DolPP-GlcNAc₁ bereits erfolgreich gewesen war (II.2.2), wurden ausgehend von den dort etablierten Bedingungen Versuche zur entsprechenden Solubilisierung in Fibroblastenmembranen begonnen.

III.1.1 Optimierung der Solubilisierungsbedingungen

In Tabelle III.1 sind die verschiedenen Versuche zur Optimierung der Solubilisierung der Alg7p-Aktivität zusammengefaßt. Ausgangspunkt war das für *S. cerevisiae* ermittelte Optimum bei 1.5 M NaCl sowie DHPC/Protein = 0.45 nmol/ μ g. Im Falle von Fibroblasten allerdings konnten bei diesen Bedingungen nur 30 % der am Ende der Optimierung erreichten Aktivität gemessen werden.

Tabelle III.1: Solubilisierungseffizienz in Abhängigkeit vom DHPC zu Protein-Verhältnis sowie der Salz-Konzentration.

Die Solubilisierungen erfolgten jeweils bei $[P] = 6.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; je Reaktion ($60 \mu\text{l}$ Endvol.) wurde Solubilisat aus $255 \mu\text{g}$ Membranprotein eingesetzt ($36 \mu\text{l}$), um $0.05 \mu\text{Ci}$ UDP- ^{14}C GlcNAc und $3.5 \mu\text{g}$ DolP 30 Minuten bei 24°C umzusetzen. Das Abstoppen der Reaktionen, die Aufarbeitung sowie die Dünnschichtchromatographie erfolgten wie unter A.2.11.2 beschrieben. Quantifiziert wurde über das Phosphorimaging-System von Packard/Optiquant und die cpm über parallel aufgetragene Standards definierter Aktivität bestimmt.

	DHPC/Protein [nmol/ μg]					
NaCl [M]	0.45	0.5	0.6	0.7	0.85	1.0
1.5	396 (30.5%)	578 (44.6%)				
1.25		530 (40.9%)	810 (62.5%)	903 (69.6%)	1206 (93%)	1297 (100%)
1.0			738 (60.4%)			
	cpm (% bezüglich 1.25 M NaCl, DHPC/Protein = 1.0 nmol/ μg)					

Aus den getesteten Kombinationen von Salzkonzentration und DHPC/P, bei denen sämtlich kein DolPP-GlcNAc₂ nachweisbar war, erwies sich 1.25 M NaCl in Kombination mit DHPC/Protein = 1.0 am effektivsten. Erstaunlicherweise liegt also hier das Detergensoptimum für die Solubilisierung weitaus höher als in *S. cerevisiae*, wo weniger als die halbe Detergensenkonzentration optimale Aktivität brachte. Bei kritischer Betrachtung ist fraglich, ob bezüglich der optimalen Salzkonzentration überhaupt ein Unterschied zum Hefesystem besteht. Für DHPC/P = 0.5 nämlich fällt die Aktivität von 578 cpm bei 1.5 M auf 530 cpm bei 1.25 M. Möglicherweise also ließe sich bei 1.5 M NaCl noch eine etwas höhere Aktivität erzielen. In dieser Richtung wurde allerdings kein weiterer Optimierungsversuch unternommen, da die erzielte Aktivität im Solubilisat für analytische Tests ausreichend hoch erschien.

III.1.2 Kinetik der solubilisierten GPT-Aktivität

Um aussagekräftige Enzymtests vornehmen zu können, war eine Kinetik für die GPT-Reaktion notwendig. Sie wurde durchgeführt von 2 bis 16 Minuten Reaktion bei 24°C . In Abb. III.1 wurden die über Phosphorimaging analysierten und quantifizierten Umsätze – für 100 % in cpm umgerechnet über einen definierten ^{14}C -Standard – gegen die Zeit aufgetragen. Als einziges Reaktionsprodukt war DolPP-GlcNAc₁ nachweisbar.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist die Reaktion über keinen großen Zeitraum linear. 100 % entsprechen etwa 2180 cpm, was bei Berücksichtigung des „Quenches“ auf Dünnschicht etwa 1/5 der eingesetzten Radioaktivität ($0.05 \mu\text{Ci}$) entspricht – zu wenig, um die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit auf Substratmangel zurückführen zu können. Dennoch konnte die Stabilität für Enzymtests zwischen 4 und 6 Minuten als ausreichend betrachtet werden. Eine Verbesserung wäre aber sicher möglich.

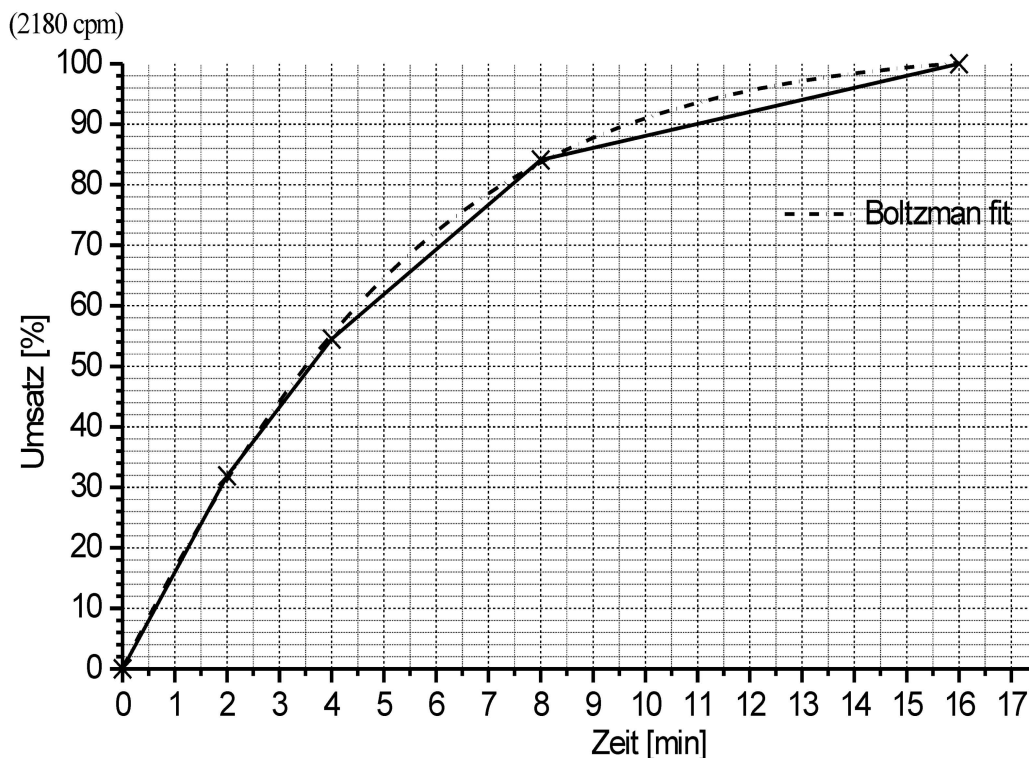


Abbildung III.1: Kinetik der solubilisierten GPT aus humanen Fibroblastenmembranen

Solubilisierung: 1.25 M NaCl, DHPC/P = 1 nmol/ μ g; [P] = 6.0 μ g/ μ l; **Reaktion:** 36 μ l Solubilisat (255 μ g Membranprotein zur Solubilisierung), 0.05 μ Ci UDP-[14 C]GlcNAc und 3.5 μ g DolP wurden bei 24°C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten abgestoppt, aufgearbeitet und über Dünnschichtchromatographie analysiert wie unter A.2.11.4 beschrieben.

Einmal könnte eine höhere Salzkonzentration im Reaktionsvolumen stabilisierend wirken. Weiter wurde NP40 verwendet, um DolP in Lösung zu bringen (0.3 % bezogen auf das Reaktionsendvolumen). Dies sollte mit DHPC ebensogut möglich sein und ist wahrscheinlich schonender für das Enzym. Zum dritten berichtet Kean für GPT aus Mikrosomen der Retina von Hühnerembryonen über ein Phänomen ähnlich der von Sharma *et al.* [109] für das Hefe-Enzym beschriebenen drastischen Inaktivierung infolge Verdünnung (vgl. II.2.2) von möglicherweise gleicher Ursache: Bei niedrigen Proteinkonzentrationen war die Rate der Synthese von DolPP-GlcNAc₁ nicht linear von der Proteinkonzentration abhängig (sehr niedrige Aktivität). Linearität stellte sich erst ab einer Mindestkonzentration von über etwa 0.6 μ g/ μ l ein. Auch bei den niedrigsten getesteten Proteinkonzentrationen war aber Linearität zu beobachten, wenn Phosphatidylglycerol anwesend war (mit einem Optimum an Aktivität bei etwa 0.3 mM). Ähnlich wie DolP-Man (vgl. III.1.3) scheint dieses Lipid allosterisch zu binden und bei gleichzeitiger Steigerung des K_M für UDP-GlcNAc sowie deutlicher Senkung für DolP die Reaktionsgeschwindigkeit signifikant zu erhöhen, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie DolP-Man und wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus. Wenn Dimerisierung oder Oligomerisierung für die Aktivität dieses Enzyms eine Rolle spielt, wofür einiges spricht [15], könnte möglicherweise Phosphatidylglycerol auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen für eine effektive Assoziierung der Monomere sorgen. Da aufgrund geringer Zellmengen bei Patienten immer die Proteinmenge ein limitierender Faktor ist und nicht beliebig gesteigert werden kann, empfiehlt es sich, eine Supplementierung mit Phosphatidylglycerol auf

ihre möglicherweise positiven Auswirkungen hin zu erproben. Hier wurde jedoch aus Zeitgründen auf weitere Optimierungen verzichtet.

III.1.3 Stimulierung der humanen GPT durch DolPMan

Eine wohl für die Regulation der LLO-Synthese sehr wichtige Eigenschaft der GPT ist die ausgeprägte Aktivierbarkeit durch DolP-Man, einem Substrat der LLO-Synthese. Detaillierte Untersuchungen von Kean *et al.* belegen sowohl das Ausmaß [53] als auch die Spezifität [54] dieser Aktivierung (vgl. auch III.1.2).

Da mit GPT die LLO-Synthese cytoplasmatisch initiiert wird, andererseits DolP-Man für die luminale Prozessierung als Mannosyldonor dient, kann DolP-Man als Sensor fungieren und für einen geregelten „Produktionsablauf“ sorgen:

Wird cytoplasmatisch durch GPT die LLO-Synthese unzureichend angestoßen, wird eine relativ hohe DolP-Man Konzentration die Folge sein, da es an Akzeptorsubstrat fehlt. Ist andererseits GPT hoch aktiv, wird DolP-Man luminal in großem Ausmaß verbraucht, die Konzentration ist folglich niedrig. Sollte nun das Vorhandensein einer größeren Menge DolP-Man für eine starke Aktivierung der GPT, die dagegen bei geringen Mengen ausbliebe, wäre eine bedarfsgerechte Reaktionsabfolge gewährleistet.

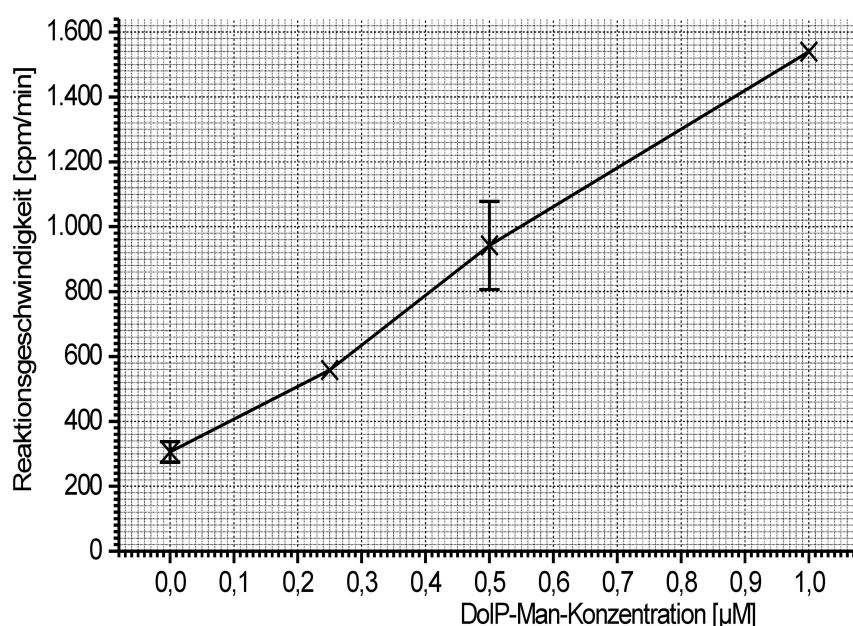


Abbildung III.2: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit solubilisierter GPT aus humanen Fibroblastenmembranen von der Konzentration an DolP-Man

Solubilisierung: 1.25 M NaCl, DHPC/P = 1 nmol/ μg ; [P] = 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **Reaktion:** 36 μl Solubilisat (255 μg Membranprotein zur Solubilisierung), 0.05 μCi UDP-[^{14}C]GlcNAc und 3.5 μg DolP wurden bei 24°C 2 oder 4 Minuten (je nach Experiment) inkubiert, abgestoppt, aufgearbeitet und über Dünnschichtchromatographie analysiert wie unter A.2.11.4 beschrieben. **Auswertung:** Die Quantifizierung erfolgte über Phosphorimaging/Optiquant, die Skalierung in cpm über einen jeweils aufgetragenen [^{14}C]-Vergleichsstandard. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittels (SEM) an und wurden für 0 μM DolP-Man aus 5, für 0.5 μM aus 2 unabhängigen Experimenten mit Solubilisat unterschiedlicher Kontrollzellen ermittelt.

Da es sich mit DolP-Man um einen allosterischen Aktivator handelt [53], könnte eine die alloste-

rische Bindungsdomäne betreffende Mutation zum Fehlen der Aktivierbarkeit führen und damit – zumindest theoretisch denkbar – zur Unterglykosylierung infolge mangelnder LLO-Syntheseinitiation durch GPT. Im einfachen *in vitro*-Enzymtest bliebe dies jedoch unbemerkt. Deshalb erfolgte zunächst ein Vortest, ob im wie oben beschrieben gewonnenen Enzymsolubilisat diese Aktivierung meßbar ist.

In einer 30 Minuten dauernden Reaktion, in der Solubilisat (1.25 M NaCl , $\text{DHPC/P} = 0.6 \text{ nmol}/\mu\text{g}$) aus $255 \mu\text{g}$ Membranprotein wie in Tab. III.1 beschrieben, aber unter Anwesenheit von $1.25 \mu\text{M}$ DolP-Man, umgesetzt wurden, war eine 7.4-fache Aktivierung zu beobachten relativ zur Vergleichsreaktion ohne DolP-Man. Dies entspricht recht gut den von Kean [53] für Mikrosomen aus embryonaler Hühner-Retina beschriebenen Werten für die Stimulierung von GPT durch DolP-Man.

Um eine geeignete DolP-Man Konzentration für Enzymtests zu ermitteln, wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der DolP-Man Konzentration systematisch untersucht. In Inkubationen von 2 bis 4 Minuten Dauer wurde die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Stimulierung (5 unabhängige Experimente), bei Stimulierung mit etwa $0.25 \mu\text{M}$ (ein Experiment), mit etwa $0.5 \mu\text{M}$ (zwei Experimente) sowie mit etwa $1 \mu\text{M}$ (ein Experiment) getestet und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Konzentration kalten DolP-Man war wie unter A.2.10.7 beschrieben abgeschätzt worden. Wie aus Abb. III.2 zu entnehmen, besteht für den getesteten Bereich eine etwa lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der DolP-Man Konzentration. Relativ zum Ausgangswert war die Stimulierung bei $0.25 \mu\text{M}$ 1.8-fach, bei $0.5 \mu\text{M}$ 3.1-fach und bei $1 \mu\text{M}$ 5-fach. Um einerseits eine deutliche Stimulierung messen, andererseits eventuelle Variationen im K_A (für allosterische Aktivierung) sensitiv detektieren zu können, wurde in späteren Patiententests auf die mittlere Testkonzentration von $0.5 \mu\text{M}$ zurückgegriffen.

III.2 Die GNT-Reaktion im Solubilisat humaner Fibroblasten

Wie sich zeigte, war die für Hefe entwickelte Solubilisierungsmethode (II.3) auch für Fibroblasten geeignet. Eine Solubilisierung bei $\text{NP40/P} = 3.8 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ und $[\text{P}] = 6.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ergab einen Enzymextrakt hoher Aktivität. Eine Zeitabhängigkeit einer solchen Reaktion ist in Abb. III.3 gezeigt. Wie erkennbar, verläuft die Reaktion weitgehend linear bis etwa 8 Minuten, wo bereits gut 76 % des angebotenen Substrats zu DolPP-GlcNAc₂ verlängert sind. Im Weiteren nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit infolge Substrataufzehrung stark ab. Nach 32 Minuten sind gut 98 % des angebotenen Substrats umgesetzt. Dies spricht nicht nur für hohe Aktivität des solubilisierten Enzyms, sondern deutet auch auf gute Stabilität hin. Tests von Patientenzymextrakten wurden im Folgenden unter den hier beschriebenen Bedingungen (A.2.11.5) zwischen 4 und 8 Minuten vorgenommen.

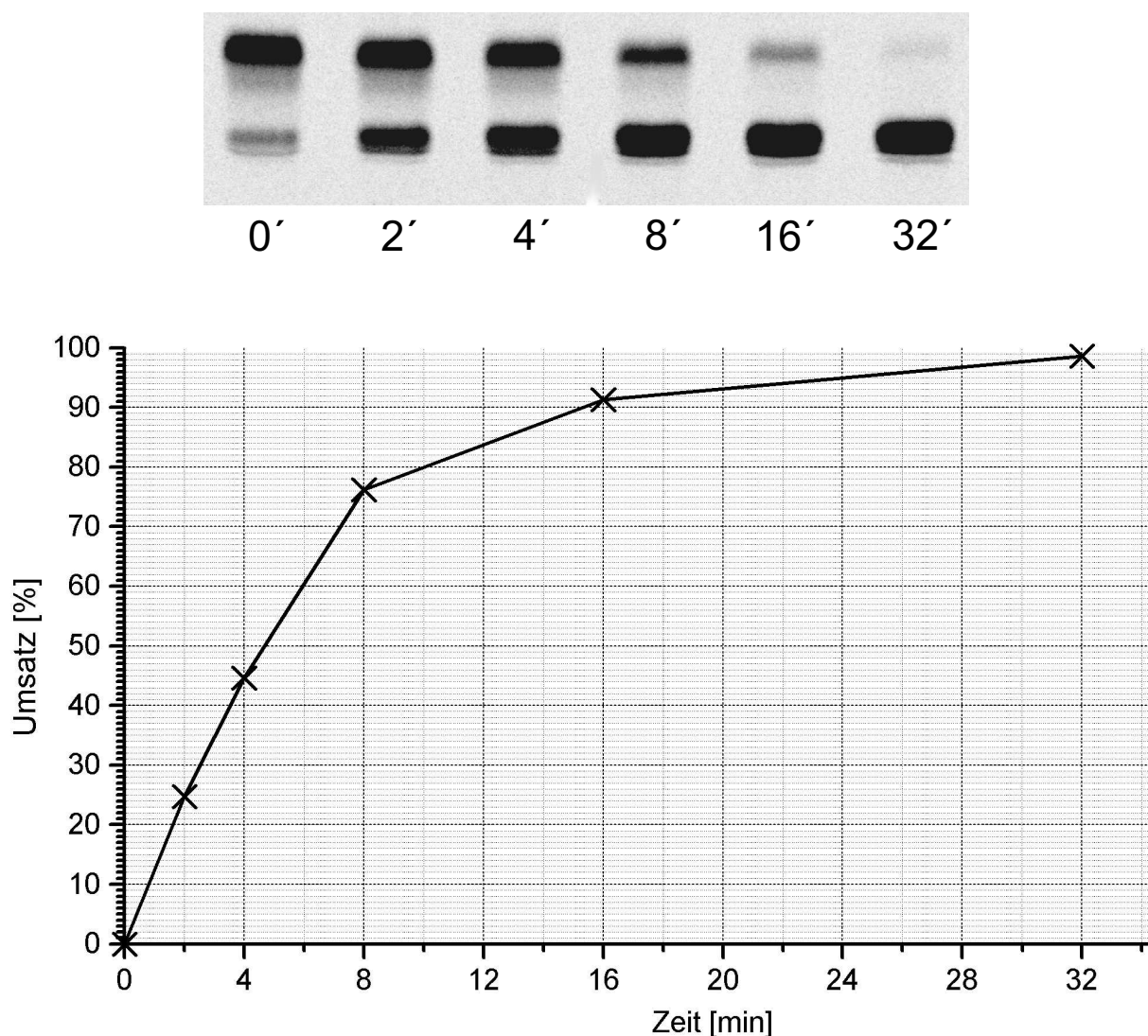


Abbildung III.3: Zeitabhängigkeit der humanen GNT-Reaktion bei Einsatz solubilisierten Enzyms
Oben: PI-Screen der Dünnschichtchromatographie mit den jeweiligen Reaktionszeiten in Minuten. Die obere Bande ist DolPP-GlcNAc₁, die untere DolPP-GlcNAc₂. **unten:** Auftrag des Umsatzes (prozentual relativ zur 0-Kontrolle) gegen die Zeit; **Solubilisierung:** NP40/P = 3.8 nmol/ μ g; [P] = 6.4 μ g/ μ l; **Reaktion:** 17.5 μ l Solubilisat (145 μ g Membranprotein zur Solubilisierung) wurden zur Verlängerung von 9000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₁ mit 100 μ M UDP-GlcNAc_{kalt} bei 17 mM MgCl₂ und 21 % Glycerin in einem Endvol. von 60 μ l die jew. angegebene Zeit in Minuten bei 24°C inkubiert, abgestoppt, aufgearbeitet und über Dünnschichtchromatographie analysiert wie unter A.2.11.5 beschrieben. **Auswertung:** Die Quantifizierung erfolgte über Phosphorimaging/Optiquant, der im Plot aufgetragene Umsatz ist bereinigt hinsichtlich der bereits im Substrat vorhandenen knapp 10 % DolPP-GlcNAc₂ (vgl. „0'“).

III.3 Aufbau eines *in vitro* Tests zur Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂ bzw. DolPP-GlcNAc₂Man₁

Grund für den Aufbau eines Tests in Fibroblasten, der die Syntheseschritte lipidgebundener Oligosaccharide (LLOs), ausgehend von DolPP-GlcNAc₂ oder DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅, zu testen möglich machen sollte, war die Entdeckung eines augenscheinlich neuartigen CDG-Falls durch die Körner-/v. Figura-Gruppe in Göttingen: Die Analyse von Serumtransferrin über isoelektrische Fokussierung sowie SDS-PAGE wies, neben einer vollständig glykosylierten Fraktion, auf einen Ausfall von ein bis zwei der in der Kontrolle vorhandenen beiden N-gebundenen Kohlenhydratketten hin; jede Kette für sich jedoch schien im Molekulargewicht nicht reduziert zu sein.

Der LLO-Pool war relativ normal, zeigte jedoch mengenmäßig eine leichte Reduzierung des Vollängen-Oligosaccharidlipids DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ im Vergleich zur Kontrolle und – noch wichtiger – eine kurzkettige LLO-Fraktion aus überwiegend DolPP-GlcNAc₂Man₁ und etwas DolPP-GlcNAc₂Man₂ – nicht vorhanden in der Kontrolle [114].

Dies, zusammen mit umfangreichen OST-Tests, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden waren und sämtlich auf normale Oligosaccharyltransferaseaktivität hindeuteten, wies auf einen Defekt im frühen LLO-Aufbau hin, der GDP-Man abhängig cytoplasmatisch orientiert am ER abläuft.

III.3.1 Verlängerung endogen in Membranen vorhandenen Dolicholphosphats über DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₂Man_x

Zunächst verliefen verschiedenste zu Anfang angestellte Versuche, DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂ in Fibroblastenmembranen mit GDP-Man zu verlängern (\pm Detergens, \pm Ultraschall) stets negativ. Wie bereits in Hefe beobachtet, scheinen kurzkettige LLO-Substrate im Gegensatz zu LLOs ab DolPP-GlcNAc₂Man₅ nur im Solubilisat umgesetzt werden zu können, was möglicherweise mit einer unterschiedlichen Orientierung bei Detergens vermittelter Integration des LLO in Mikrosomen zusammenhängt. Die gleiche Detergensmenge gemischt mit Membranen hat somit nicht den gleichen Effekt wie zur Solubilisierung verwendet, bei der nur das nach Ultrazentrifugation im Überstand befindliche klare Solubilisat in der Reaktion eingesetzt wird.

Um dieses Problem zu umgehen wurde versucht, in Membranen endogen vorhandenes DolP mit UDP-[¹⁴C]GlcNAc zunächst zu DolPP-GlcNAc_{1/2} umzusetzen und im Anschluß durch Zugabe von GDP-Man eine weitere Verlängerung zu erreichen. Bereits hier wurde neben der Kontrolle auch schon der beschriebene Patient untersucht: 145 μ g Membranprotein wurden jeweils mit 0.05 μ Ci UDP-[¹⁴C]GlcNAc 15 Minuten bei 24°C inkubiert. Die niedrige Temperatur wurde wegen der bekanntermaßen instabilen ersten Transferase, GPT, gewählt. Dann erfolgte ein Temperaturshift auf 32°C: Möglicherweise war ja der enzymatische Defekt im Patienten bei tieferen Temperaturen gar nicht so ausgeprägt. Erst nach Erreichen der 32°C (innerhalb etwa einer Minute) erfolgte die GDP-Man-Zugabe auf 0.5 mM Endkonzentration und weitere 15 Minuten Inkubation. Die Reaktion wurde mit C/M 2:1 gestoppt und wie unter A.2.11.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Analyse der „lower phases“ erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (Abb. III.4). Folgendes ist zu beobachten:

1. In der 15 Minuten GlcNAc-Kontrollreaktion wird bei Kontrolle wie Patient sowohl DolPP-GlcNAc₁ als auch DolPP-GlcNAc₂ gebildet. Daneben tritt in geringerem Umfang bereits ohne exogen zugegebenes GDP-Man DolPP-GlcNAc₂Man₁ und etwas DolPP-GlcNAc₂Man₅

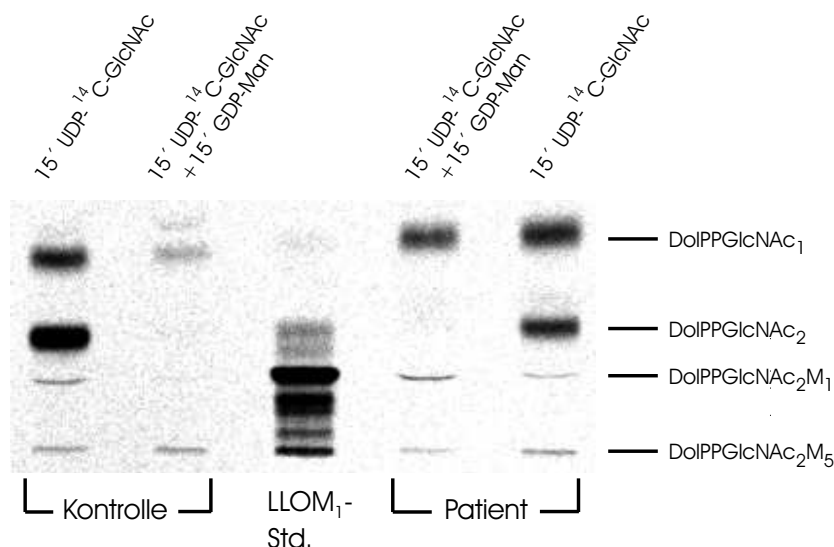


Abbildung III.4: „GDP-Man-Chase“ in Fibroblastenmembranen aus Kontrolle und Patient: Bildung von DolPP-GlcNAc₂ aus endogenem DolP und UDP-[¹⁴C]GlcNAc über 15 Minuten bei 24°C; wo vermerkt, anschließend 15 Minuten Reaktion bei 32°C und 0.5 mM GDP-Man
Lower phase-Extrakte, Dünnschichtchromatographie Silica G60, Laufmittel C/M/H 65:25:4

auf. Dies wurde bereits in früheren Experimenten beobachtet und muß auf endogen vorhandenes GDP-Man zurückgeführt werden.

2. Wird die Reaktion nach 15 Minuten GlcNAc-Inkubation bei 24°C weitere 15 Minuten bei 32°C mit 0.5 mM GDP-Man fortgeführt, läßt sich folgendes beobachten:

- In der Kontrolle ist die DolPP-GlcNAc₂Man₁-Bande vollständig verschwunden, ebenso DolPP-GlcNAc₂; von DolPP-GlcNAc₁ bleiben noch 14 %. Ausgehend von DolPP-GlcNAc₂ über DolPP-GlcNAc₂Man₁ fand also eine Verlängerung mindestens bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ statt, das – nunmehr zu polar – kaum mehr in der „lower phase“ zu finden ist (deshalb nur geringe Menge am Ursprung). Die starke Reduktion auch von DolPP-GlcNAc₁ ist mit einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts durch den Verbrauch von DolPP-GlcNAc₂ zu erklären. Noch in ausreichendem Umfang im Reaktionsansatz vorhandenes UDP-[¹⁴C]GlcNAc führt dann zur Neubildung von DolPP-GlcNAc₂ aus DolPP-GlcNAc₁, das so weitgehend umgesetzt wird.
- Im Patienten kommt es wie in der Kontrolle zur vollständigen Verlängerung von DolPPGlcNAc₂. Dagegen aber wuchs die DolPP-GlcNAc₂Man₁-Bande im Vergleich zur GlcNAc-Kontrollreaktion sogar um 65 % an und 74 % des in der GlcNAc-Kontrollreaktion vorhandenen DolPPGlcNAc₁ bleiben unverlängert.

Trotz der schwachen Signale lassen diese deutlichen Differenzen zwischen Kontrolle und Patient, die in einem weiteren Experiment dieser Art ihre Bestätigung finden, folgende Schlüsse zu:

Die beim Patienten in Gegenwart von GDP-Man kontrastierend zur Kontrolle sogar noch anwachsende Menge an DolPP-GlcNAc₂Man₁ legt einen Defekt in der nachfolgenden α-Mannosyltransferase nahe, der allerdings „leaky“ zu sein scheint.

Was weiterhin auffällt, ist der im Vergleich zur Kontrolle sehr hohe Restanteil an DolPP-GlcNAc₁,

der hier kaum verlängert wird. Da die Lipidoligosaccharidsynthese über Intermediathemmung bzw. -stimulierung den Ergebnissen von Kean *et al.* ([56] und frühere, darin zitiert Veröffentlichungen) zufolge stark reguliert ist, scheint eine negative Rückkopplung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ auf die zweite GlcNAc-Transferase plausibel (meines Wissens gibt es bisher keine Veröffentlichung dazu) und würde so zu der im Vergleich zur Kontrolle auffällig höheren Restmenge an DolPP-GlcNAc₁ im Chase-Experiment führen.

In jedem Fall muß aber ein Defekt in der Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ zu DolPP-GlcNAc₂Man₂ angenommen werden.

Unter Berücksichtigung früherer Experimente, wo unter nahezu gleichen experimentellen Bedingungen, bereits vom Reaktionsstart an mit GDP-Man im Ansatz, versucht wurde, das endogen in Membranen vorhandene DolP über DolPP-GlcNAc₂ hinaus zu verlängern, dabei aber keinerlei radioaktiv markierte LLOs in der lower phase zu detektieren waren, wird auch verständlich, weshalb im hier vorliegenden Experiment ab Zugabe von GDP-Man keine Neubildung von radioaktiven GlcNAc-Lipiden mehr erfolgt. In Membranen ist ein weiteres Enzym, die DolP-Man Synthase, äußerst aktiv, bei weitem aktiver als die erste GlcNAc-Transferase. Die begrenzte Menge an endogenem DolP wird wahrscheinlich schnell verbraucht durch die Bildung von DolP-Man, das wiederum zur Verlängerung von LLOMan₅ führen und so das Reaktionsgleichgewicht noch weiter auf die Produktseite verschieben könnte.

Zwar war dieses Vorexperiment, in dem der endogene DolP Pool genutzt wurde, erfolgreich. Doch war einerseits ein stärkeres Signal wünschenswert, andererseits der Einsatz eines diskreten Substrates definierter Menge – nicht wie hier, wo die Substratmenge sowohl von der Größe des endogenen DolP Pools, als auch von der Aktivität der beiden GlcNAc-Transferasen abhängig war. Infolgedessen wurden verschiedene Versuche zur Solubilisierung unternommen, um in Hefe synthetisiertes Akzeptorsubstrat DolPP-GlcNAc₂Man₁ einsetzen zu können.

III.3.2 Entwicklung einer geeigneten Solubilisierungsmethode zur Verlängerung von DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁

Mehrere vergebliche Versuche zur Solubilisierung der Mannosyltransferaseaktivitäten aus Fibroblastenmembranen fanden in Gegenwart von Glycerin statt. Jensen und Schutzbach hatten in einer Reihe von Veröffentlichungen (1980, 1981 und 1982) [47–49, 104] verschiedene Mannosyltransferasen aus Schweine- bzw. Kaninchen-Leber charakterisiert, ausgehend von einem Tetrasaccharidlipid (Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc₂-PPDol), Enzymsolubilisat unter Verwendung von Tris-Acetat-Puffer pH 7.0, NP40 (D/P = 0.2 - 0.35 nmol/ μ g) und GDP-Mannose. Eine α 1,3-Mannosyltransferase aus Kaninchen-Leber wurde teilweise gereinigt und erwies sich als stark inhibierbar durch Glycerin sowie GDP. Da es denkbar erschien, daß Glycerin auch im humanen Fibroblastensolubilisat hemmend wirken könnte, wurden wie folgt neue Ansätze konzipiert:

1. Solubilisierung und Reaktion sollten ohne Glycerin stattfinden, das möglicherweise hemmend auf die α 1,3-Transferase wirken könnte. Als Ersatz für die stabilisierende Wirkung von Glycerin sollte einem Ansatz 500 mM Saccharose beigelegt werden.
2. Solubilisierung und Reaktion sollten nicht wie bisher bei etwa pH 6.6, sondern mehr zum Neutralen hin verschoben stattfinden. Zudem sollte neben Tris-Puffer eine Pufferalternative erprobt werden. Deshalb kam einmal 30 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 7.0, zum anderen 20 mM Tris-Puffer pH 7.1-7.2 zum Einsatz.

3. Bezüglich der Detergensenmenge fand eine Orientierung am Solubilisierungsoptimum für die gekoppelte Aktivität von Alg7p (GPT) und der GlcNAc-Transferase (GNT) statt: Ersteres Protein ist äußerst detergensenstabil, zweiteres sehr robust. Das Optimum für die DolPP-GlcNAc₂-Synthese ausgehend von DolP und UDP-GlcNAc über die gekoppelte Aktivität beider Enzyme liegt bei NP40/P = 2.5 nmol/μg. Infolgedessen sollte nun dieses Detergens/Protein-Verhältnis bei einer [P] = 6.5 μg/μl angewandt werden.
4. Auch bei der Hochsalz-DHPC-Solubilisierung zur DolPP-GlcNAc₂Man₁-Produktion in Hefe (II.4.1) fand eine geringfügige Verlängerung über DolPP-GlcNAc₂Man₁ hinaus statt. Hier sollten nun diese Bedingungen auf Fibroblasten angewendet werden (DHPC/P = 1.35 nmol/μg, 800 mM NaCl) aber ohne Glycerin, in der Hoffnung, daß nur der hohe Glycerinanteil einer weiteren Verlängerung im Wege stand.
5. Für jede Reaktion wurden 300 μg Membranprotein solubilisiert. Damit sollten 3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁ mit 3 mM GDP-Man umgesetzt werden (30 Minuten bei 24°C). Weitere experimentelle Details liefen grundsätzlich ab wie unter A.2.11.7 beschrieben.

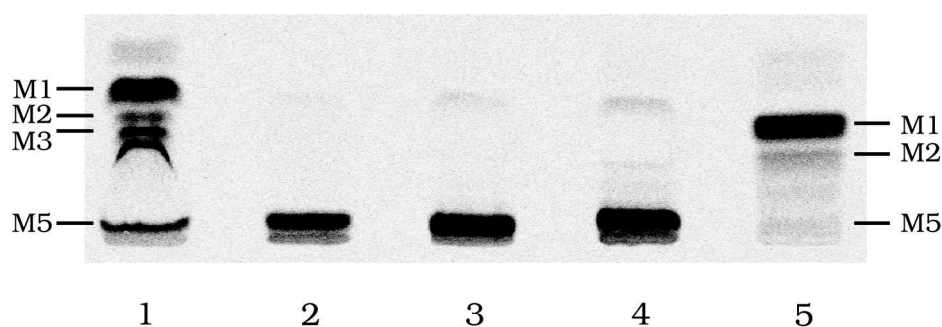


Abbildung III.5: Versuche zur Solubilisierung von Mannosyltransferaseaktivitäten aufwärts DolPP-GlcNAc₂Man₁ aus humanen Fibroblastenmembranen

Spur 1: 800 mM NaCl/DHPC-Solub., Tris pH 7.2; **Spur 2:** NP40-Solub., 500 mM Saccharose, Citrat/Phosphat pH 7.0; **Spur 3:** NP40-Solub. Citrat/Phosphat pH 7.0; **Spur 4:** NP40-Solub., Tris pH 7.2; **Spur 5:** DolPP-GlcNAc₂Man₁-Standard. Bei Ansatz in Spur 2 Substanzverlust wegen Glasbruchs und deshalb geringere Intensität. Jeweils 3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁, 3 mM GDP-Man, Solubilisat aus 300 μg Membranprotein und 30 Minuten Reaktion bei 24°C. Reaktionsstop und Aufarbeitung wie unter A.2.11.7 beschrieben; dünnschichtchromatographische Trennung in C/M/H 65:25:4.5, Auswertung über Phosphorimaging.

In allen drei NP40-Solubilisierungen fand, unabhängig davon, ob Citrat/Phosphatpuffer oder Tris-Puffer, ob mit oder ohne Saccharose, Verlängerung bis zu einer Oligosaccharidlänge statt, die kaum mehr vom Ursprung wegwandert und sich später über HPLC-Analysen als DolPP-GlcNAc₂Man₅ herausstellte (Abb. III.5, Spuren 2 bis 4). Dagegen war die DHPC/NaCl-Solubilisierung weniger erfolgreich (Spur 1 in Abb. III.5): 42 % des DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrats bleiben unumgesetzt (oberste Bande). Die folgenden beiden Banden lassen sich recht sicher als DolPP-GlcNAc₂Man₂ (5.0 %) und DolPP-GlcNAc₂Man₃-Intermediat (9.6 %) zuordnen. Höchstwahrscheinlich ist die folgende Bande Teil der DolPP-GlcNAc₂Man₅-Bande und aufgrund einer Bandenspreizung durch eine nicht ansprechbare, Substanz (NaCl?) nach oben verschoben. In diesem Fall betrüge der

DolPP-GlcNAc₂Man₅-Anteil 42.3 %. Sollte es sich doch um DolPP-GlcNAc₂Man₄ handeln, wäre dessen Anteil 27.7 %, der von DolPP-GlcNAc₂Man₅ 14.6 %. Diese Intermediat-Banden zwischen Substrat und DolPP-GlcNAc₂Man₅-Produkt kennzeichnen möglicherweise einen gewissen Rückstau, der für einen verlangsamten Reaktionsverlauf von DolPP-GlcNAc₂Man₃ nach DolPP-GlcNAc₂Man₅ sprechen könnte.

Eher willkürlich wird das Tris/NP40-System ohne Saccharose-Zusatz als System für die GDP-Man abhängige Verlängerung von LLOs in Fibroblasten beibehalten.

III.3.3 Kinetik der Reaktionen DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ im Fibroblastensolubilisat

III.3.3.1 Optimierung der Reaktionsparameter und Kinetik der Reaktionen DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ im Solubilisat von Kontrollfibroblasten

Um den zeitlichen Ablauf der Reaktionen von DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅, sowie die dabei sukzessive auftretenden Intermediate zu untersuchen, wurden zunächst Kinetiken durchgeführt und durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Gleichzeitig dienten diese Experimente dazu, die Reaktionsbedingungen noch weiter zu verfeinern und letztlich zu dem unter A.2.11.7 beschriebenen Standardprotokoll zu gelangen.

Eine bereits unter weitgehend optimierten Bedingungen durchgeführte Kinetik ist in Form der Dünnschichtchromatographie in Abb. III.6 gezeigt. Alle Intermediate außer DolPP-GlcNAc₂Man₄ lassen sich hier klar ansprechen. DolPP-GlcNAc₂Man₄ ist mengenmäßig ähnlich schwach vertreten wie DolPP-GlcNAc₂Man₂ (siehe dazu HPLC-Analyse, Abb. III.11) und trennt sich in diesem System kaum von DolPP-GlcNAc₂Man₅. Hier wurde noch mit einem Detergens zu Protein-

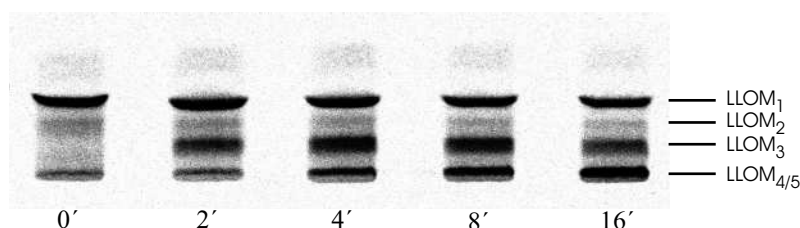


Abbildung III.6: Solubilisat aus Kontrollfibroblasten: Kinetik der DolPP-GlcNAc₂Man₁-Verlängerung mit GDP-Man bei 37°C

Dünnschichtchromatographie der Extrakte aus Lower- und Interphase: Silica G60, Laufmittel CHCl₃/CH₃OH/H₂O 65:25:4.1; die Reaktionen wurden bei den angegebenen Zeiten (Minuten) abgestoppt. Zeit 0 entspricht dem eingesetzten DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrat. **Reaktionsbedingungen:** Fibroblastensolubilisat aus 50 µg Membranprotein je Reaktion (NP40/P = 2.5 nmol/µg zur Solubilisierung), 3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁, 1 mM GDP-Man.

Verhältnis von 2.5 nmol/µg gearbeitet. Wie ersichtlich, erfolgte der Umsatz von DolPP-GlcNAc₂Man₁ (LLOM₁) selbst im längsten Inkubationszeitraum von 16 Minuten nicht quantitativ. Durch Reduzierung des Detergens zu Protein-Verhältnisses auf 2.3 nmol/µg konnte schließlich ein quantitativer und schnellerer Umsatz erzielt werden. Dies ist in Abb. III.7 zu sehen, wo Kinetiken für zwei Zeitfenster nach Dünnschichtchromatographie quantifiziert wurden und in Form der prozentualen Intermediatanteile, aufgetragen gegen die Zeit, dargestellt sind. Bereits innerhalb von 4 Minuten werden über 80 % des eingesetzten DolPPGlcNAc₂Man₁-Substrats nach DolPPGlcNAc₂Man₅ umgesetzt, innerhalb von 8 Minuten erfolgt ein praktisch quantitativer Umsatz zu DolPPGlcNAc₂Man₅.

Dies bedeutet also, daß die hier untersuchten Enzyme gegenüber höheren NP40-Mengen sensibel reagieren – in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Jensen und Schutzbach 1981 [48], die für eine partiell gereinigte α 1,3-Mannosyltransferase (und wie sich unter III.5.3 herausstellen wird, verkörpert diese Transferase das Enzym von DolPP-GlcNAc₂Man₁ nach DolPP-GlcNAc₂Man₂) ausgesprochen hohe NP40-Sensitivität berichteten.

Aus Abb. III.7 unten wird deutlich, wie schnell die Bildung von DolPP-GlcNAc₂Man₃ vor sich geht, ohne daß nennenswerte Mengen von DolPP-GlcNAc₂Man₂ auftreten. Damit ist DolPP-GlcNAc₂Man₃ das einzige Intermediat, das in größerem Umfang akkumuliert. Zwischen ein und zwei Minuten erreicht es einen Anteil von etwa 30-50 % (vgl. Abb. III.8 und III.11 für die Kontrolle und Abb. IV.11 für Kontrolle und Patient). Nur leicht verzögert steigt dann DolPP-GlcNAc₂Man₅ schnell an, während der Umfang von DolPP-GlcNAc₂Man₄ marginal bleibt.

Warum aber sollten nun die Intermediate DolPP-GlcNAc₂Man₂ und DolPP-GlcNAc₂Man₄ in so viel niedriger Konzentration auftreten als DolPP-GlcNAc₂Man₃? Würden einmal Enzym 1 (LLOMan₁ → LLOMan₂) und Enzym 2 (LLOMan₂ → LLOMan₃), zum anderen Enzym 3 (LLOMan₃ → LLOMan₄) und Enzym 4 (LLOMan₄ → LLOMan₅) einen Komplex ausbilden, wäre die lokale Konzentration der LLO-Substrate der Enzyme 2 und 4, nämlich DolPP-GlcNAc₂Man₂ und DolPP-GlcNAc₂Man₄ besonders hoch. Sie bekämen diese Intermediate von ihrem Komplexpartner quasi „weitergereicht“. Diese hohe lokale Konzentration würde zu einem schnellen Umsatz führen und es käme zu keiner nennenswerten Anhäufung von LLOMan₂ und LLOMan₄. Dagegen läge das Produkt von Enzym 2 bzw. Edukt von Enzym 3, nämlich DolPP-GlcNAc₂Man₃, in „Freiheit“ vor: Um zu ähnlich hohen Eduktkonzentrationen zu kommen wie sie lokal in den postulierten Komplexen herrschten, müßte sich eine wesentlich größere Menge akkumulieren – was ja auch experimentell zu beobachten ist.

Für diese Hypothese sprechen nun nicht nur die hier vorliegenden Daten aus den *in vitro*-Experimenten. Jensen und Schutzbach berichteten bereits bei ihrem Versuch, die α 1,3-Mannosyltransferaseaktivität zu reinigen, von dem Problem, daß selbst nach 660-facher Aufreinigung und Abtrennung von jeglicher α 1,2-Mannosyltransferaseaktivität noch immer eine α 1,6-Restaktivität enthalten war [48]. Dies könnte durchaus für einen stabilen Komplex zwischen α 1,3- und α 1,6-Transferase (Enzymen 1 und 2, siehe III.5.3) sprechen.

Auch für einen Komplex der beiden α 1,2-Mannosyltransferasen gibt es Hinweise: In ihrer Veröffentlichung zum *S. cerevisiae* ALG11-Gen untersuchten Cipollo *et al.* [12] detailliert den Δ alg11-Disruptionsstamm sowohl hinsichtlich der Zusammensetzung des LLO-Pools und seiner Saccharid-Strukturen, als auch in Hinsicht auf die proteingebundenen Oligosaccharidstrukturen (siehe auch Einleitung). Und obgleich das beschriebene ALG11 aller Wahrscheinlichkeit nach die für den Schritt von DolPP-GlcNAc₂Man₄ nach DolPP-GlcNAc₂Man₅ verantwortliche α 1,2-Mannosyltransferase codiert, ist das Bild doch keineswegs ungetrübt klar: In der LLO-Fraktion dieser Disruptante reichert sich nicht, wie zu erwarten wäre, eine DolPP-GlcNAc₂Man₄-Fraktion an. Vielmehr gibt es eine signifikante DolPP-GlcNAc₂Man₃-Fraktion, deren Ursache der Erklärung harrt. Desweiteren zeigen die Autoren mittels Strukturanalysen der längerkettigen, luminalen LLO-Fraktion, daß etwa 50 % der translozierten LLOs auf DolPP-GlcNAc₂Man₃ zurückgehen, nur die anderen 50 % haben in DolPP-GlcNAc₂Man₄ ihren Ursprung. Selbst proteingebunden machen die von DolPP-GlcNAc₂Man₃ herrührenden Oligosaccharide einen recht großen Anteil aus.

Die Autoren argumentieren nun, ein schlechter Transfer („flipping“) von DolPP-GlcNAc₂Man₄ ins Lumen des ER führte dazu, daß vermehrt DolPP-GlcNAc₂Man₃ ins Lumen transloziert würde. Dies Argument scheint wenig einleuchtend: Würde DolPP-GlcNAc₂Man₄ wirklich so schlecht transloziert, sollte auch ein DolPP-GlcNAc₂Man₄-Pool nachweisbar sein – was nicht der Fall ist.

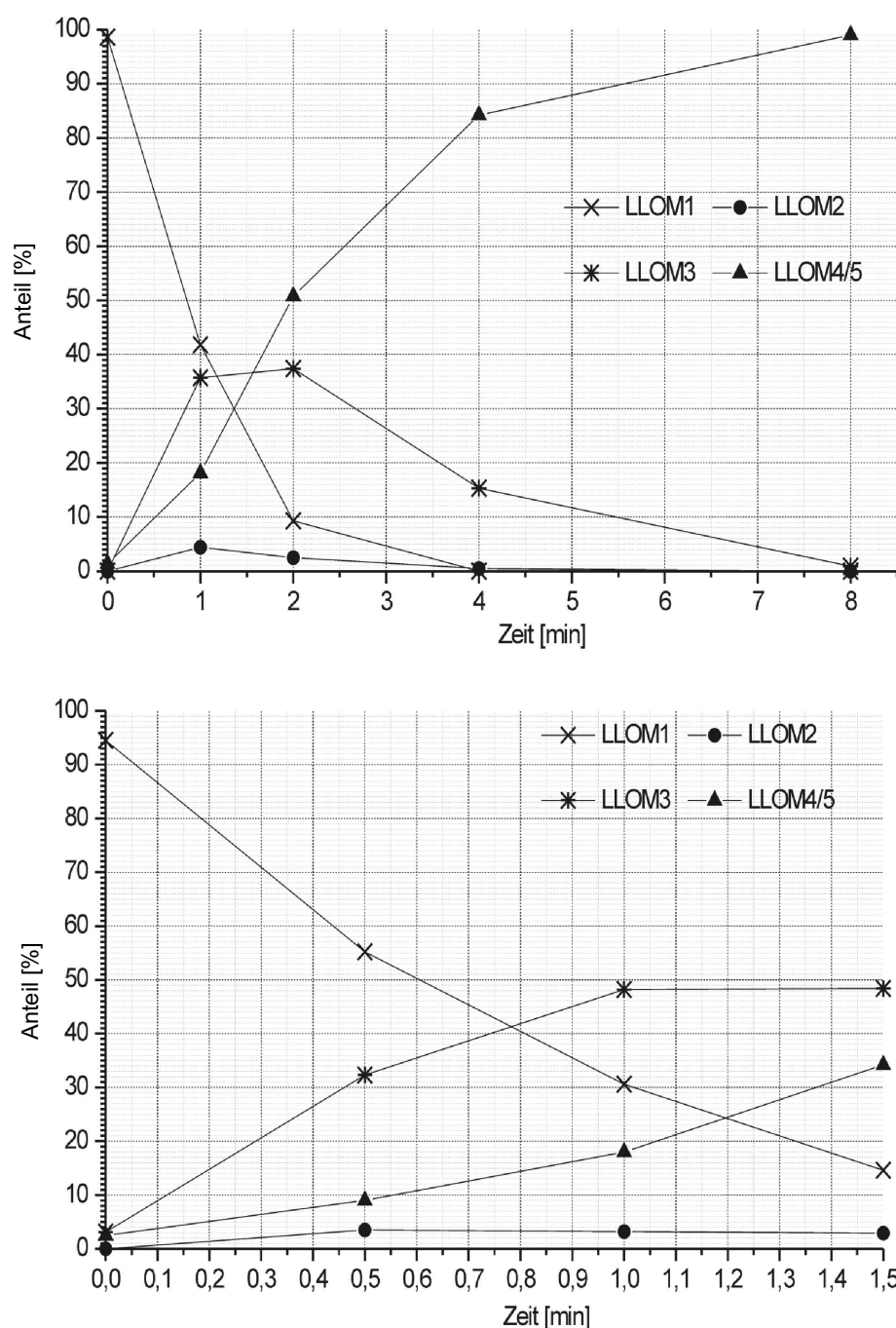


Abbildung III.7: Kinetik und Kurzzeitkinetik der DolPP-GlcNAc₂Man₁-Verlängerung mit GDP-Man in Kontrollfibroblastensolubilisat: endgültige Solubilisierungs- und Reaktionsbedingungen. Extrakte aus Lower- und Interphase wurden via Dünnschichtchromatographie Silica G60, Laufmittel CHCl₃/CH₃OH/H₂O 65:25:4.1 analysiert, über Phosphorimaging und Optiquant-Software quantifiziert und die jeweiligen LLO-Fractionen prozentual gegen die Zeit aufgetragen. Zeit 0 entspricht dem Ausgangssubstrat DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁.

Oben: Langzeitkinetik, **unten:** Kurzzeitkinetik: Beide Experimente sind **völlig unabhängig voneinander**, d. h. verschiedene Membranpräparationen und Solubilisierungen. **Reaktion:** Fibroblastensolubilisat aus 56 µg Membranprotein je Reaktion (NP40/P = 2.3 nmol/µg zur Solubilisierung), 3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁, 1 mM GDP-Man, 37°C.

Insofern kann aber auch nicht von einer Endprodukthemmung oder dergleichen der ersten $\alpha 1,2$ -Transferase durch ihr Produkt, DolPP-GlcNAc₂Man₄, ausgegangen werden. Vielmehr scheint DolPP-GlcNAc₂Man₄ erst gar nicht in ausreichendem Umfang zu entstehen. Aber all das, was entsteht, muß sofort effektiv ins ER transloziert werden. Dort erfolgt die weitere Verlängerung bis DolPP-GlcNAc₂Man₈Glc₃ und dann der Transfer durch die OST auf naszierende Polypeptidketten.

Von der OST wiederum ist bekannt, daß eine ausgesprochen stark ausgeprägte Selektivität für das Vollängen-Oligosaccharidlipid besteht – solange dies in ausreichendem Umfang vorhanden ist. Erst bei drastischem Mangel an Vollängen-LLO werden auch kürzerkettige Oligosaccharide übertragen – dann aber praktisch ebenso effektiv wie das Vollängen-Substrat [52]. Da von transloziertem DolPP-GlcNAc₂Man₃ herrührende LLOs maximal bis DolPP-GlcNAc₂Man₇ luminal prozessiert werden (keine Glucosylierung möglich), stellen diese LLOs, insbesondere aufgrund des Fehlens der drei Glucose-Einheiten, zweifelsohne ein weitaus schlechteres Substrat für die OST dar als DolPP-GlcNAc₂Man₈Glc₃. Wenn sich dennoch ein signifikanter Anteil der proteingebundenen Oligosaccharide auf ins ER-Lumen transloziertes DolPP-GlcNAc₂Man₃ (und damit von der OST akzeptiertes DolPP-GlcNAc₂Man₇) zurückführen lassen, spricht das für einen ernsten Mangel an DolPP-GlcNAc₂Man₈Glc₃-Substrat (und damit DolPP-GlcNAc₂Man₄).

Alles in allem heißt das, daß zwar in *S. cerevisiae alg11Δ* tatsächlich substantiell nur die DolPP-GlcNAc₂Man₄ nach DolPP-GlcNAc₂Man₅ prozessierende $\alpha 1,2$ -Mannosyltransferase betroffen ist. Dennoch scheint die nachweislich vorhandene (sonst entstünde ja absolut kein DolPP-GlcNAc₂Man₄), für die Prozessierung von DolPP-GlcNAc₂Man₃ nach DolPP-GlcNAc₂Man₄ zuständige, $\alpha 1,2$ -Transferase in ihrer Aktivität sehr stark eingeschränkt. Postuliert man nun einen Komplex aus diesen beiden Transferasen – wofür die hier vorliegenden *in vitro*-Daten sprechen – in dem beide Enzyme, eng assoziiert, ihre Aktivität in gewisser wechselseitiger Abhängigkeit entfalten, erklärt sich dieses Phänomen ganz zwanglos.

Es gibt also gute Gründe, in der Tat einen Komplex aus Enzym 1 und 2 einerseits und 3 und 4 andererseits anzunehmen. Auf diese Weise würde Sorge getragen, daß einerseits die höchst wichtige und strukturell komplexe Verzweigung an der initialen, $\beta 1,4$ -gebundenen Mannose korrekt abläuft ($\alpha 1,3$ - und $\alpha 1,6$ -Ast), andererseits in schneller Folge beide $\alpha 1,2$ -gebundenen Mannosen addiert und so eine vorschnelle Translokation von DolPP-GlcNAc₂Man₄ zuverlässig vermieden würde. Denn dies scheint, wie aus [12] ersichtlich (kein LLOM₄ nachweisbar), zumindest in $\Delta alg11$ sehr effektiv möglich zu sein. Dagegen weist die Akkumulation von DolPP-GlcNAc₂Man₃ in $\Delta alg11$ deutlich darauf hin, daß dieses Intermediat erheblich schlechter transloziert wird – was auch physiologisch sinnvoll wäre. Denn wie den hier gezeigten *in vitro*-Experimenten zu entnehmen, ist es gerade DolPP-GlcNAc₂Man₃, das im Ablauf der Prozessierung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ nach DolPP-GlcNAc₂Man₅ als einziges Intermediat in nennenswertem Umfang auftritt.

III.3.3.2 Vergleichskinetik der DolPP-GlcNAc₂Man₁-Verlängerung im Solubilisat aus Kontrolle und Patient

Unter Anwendung der oben ermittelten experimentellen Bedingungen wurde jeweils eine Kinetik mit Solubilisat aus Kontroll- und Patientenfibroblasten durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. III.8 dargestellt. Während links in der Kontrolle die Reaktion spätestens nach 8 Minuten abgelaufen ist und DolPP-GlcNAc₂Man₁ praktisch vollständig zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ verlängert wurde, ist im Patienten nach 16 Minuten noch immer etwa 50 % des DolPP-GlcNAc₂Man₁ Substrats nicht umgesetzt. Bezeichnenderweise reichern sich so gut wie keine Intermediate an, wie dies besonders nach 2 Minuten in der Kontrolle sehr wohl der Fall ist. Aus dem Experiment geht damit klar

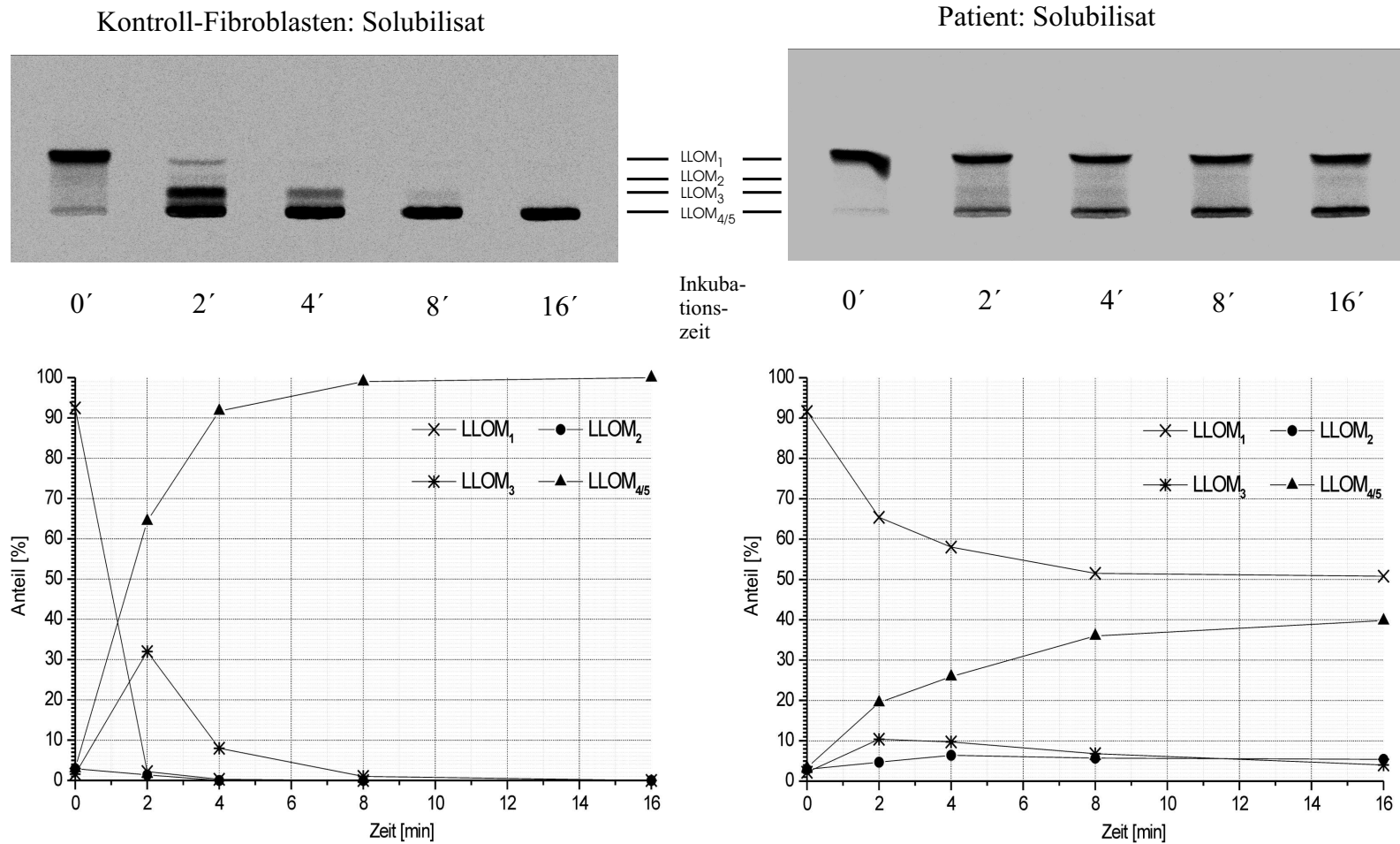


Abbildung III.8: Kinetik der GDP-Man-Verlängerung: Kontrolle versus Patient

Oben: Dünnschichtchromatographie der Extrakte aus Lower- und Interphase, Laufmittel CHCl₃/CH₃OH/H₂O 65:25:4.1; die Reaktionen wurden bei den angegebenen Zeiten (Minuten) abgestoppt. Zeit 0 entspricht dem eingesetzten DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrat. Unten: Nach Quantifizierung der einzelnen LLO-Intermediate (PI-Screen/Optiquant) wurde deren jeweilige Anteilsgröße prozentual gegen die Zeit aufgetragen.

Fibroblastensolubilisat aus 56 µg Membranprotein je Reaktion, NP40/P = 2.3 nmol/µg; 3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁, 1 mM GDP-Man.

hervor, daß beim untersuchten Patienten bereits der Schritt von DolPP-GlcNAc₂Man₁ nach DolPP-GlcNAc₂Man₂ betroffen ist. Alles, was dieses „Nadelöhr“ passiert, wird offensichtlich mit normalen Aktivitäten weiterprozessiert. Andernfalls wäre das Ausbleiben jeglicher LLO-Intermediate zwischen DolPP-GlcNAc₂Man₁ und DolPP-GlcNAc₂Man₅ kaum zu erklären. Das hieße, daß der Defekt von DolPP-GlcNAc₂Man₁ nach DolPP-GlcNAc₂Man₂ der *einzigste* in der Kette bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ wäre.

Parallele genetische Analysen von Thiel/Körner aus Göttingen legten nahe, daß das humane Homolog zum Hefe-Alg2p betroffen wäre [114]. Die Hefe *alg2*-Mutante akkumuliert sowohl DolPP-GlcNAc₂Man₁ als auch, in etwas geringerem Umfang, DolPP-GlcNAc₂Man₂ [38,42]. Da weder klar war, welches Protein *ALG2* kodiert, noch in welcher Reihenfolge die Assemblierung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ nach DolPP-GlcNAc₂(α 1,3Man) α 1,6Man stattfindet (ob also zunächst die α 1,3-Transferase und anschließend die α 1,6-Transferase aktiv wird, oder umgekehrt), war es unbedingt nötig, zwischen beiden Reaktionen differenzieren zu können (vgl. dazu Abb. III.14).

III.4 Suche nach Wegen zu einem definierten DolPP-GlcNAc₂-Man₂-Substrat

Um unterscheiden zu können, welche der beiden in Frage kommenden Transferasen defekt wäre, die α 1,3- oder die α 1,6-Mannosyltransferase, sollte ein definiertes DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrat angeboten werden, in dem entweder die eine, oder die andere Bindung vorliegt. Vorausgesetzt, dies würde in Kontrollzellen verlängert, könnte aus der Verlängerung oder ausbleibenden Verlängerung im Patienten auf die Spezifität des defekten Enzyms geschlossen werden. Im Folgenden werden die verschiedenen Versuche geschildert, ein solches Substrat zu erlangen.

III.4.1 Irrwege

III.4.1.1 Versuch der Inhibierung der α 1,3-Transferase mit GDP

Da Jensen *et al.* (1981) [48] für die α 1,3-Mannosyltransferase aus Kaninchenleber Produkthemmung bzgl. GDP berichteten (50 % Inhibierung bei 0.6 μ M GDP und 2.6 μ M GDP-Man) war die Idee, dieses Enzym evtl. auch in humanen Fibroblasten auf diese Weise hemmen zu können. Zum einen, um ein spezifisches DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrat in Kontrollzellen anzureichern und zu isolieren, das dann in Patientenzellen zum differentiellen Transferasetest geeignet wäre; zum anderen, um evtl. schon im Dünnschichtchromatogramm der Patientenextrakte Rückschlüsse erlaubende Veränderungen zu sehen. Denn wie in Abb. III.8 gezeigt, fehlen in der Patientenkinetik nahezu völlig Zwischenstufen zwischen DolPP-GlcNAc₂Man₁ und DolPP-GlcNAc₂Man₅. Der Defekt im ersten, DolPP-GlcNAc₂Man₂ bildenden Enzym, ist so gravierend, daß die geringe Menge an gebildetem DolPP-GlcNAc₂Man₂ sofort von den folgenden intakten Enzymen verlängert und damit verbraucht wird. Sollte nun das 2. Enzym die α 1,3-Transferase und durch GDP zu hemmen sein, wäre möglicherweise allein aufgrund der „leakyness“ des ersten Enzyms eine gewisse Anreicherung von DolPP-GlcNAc₂Man₂ zu erwarten; mindestens jedoch sollte dies in der Kontrolle zu beobachten sein. Wäre jedoch das erste, im Patienten defekte Enzym durch GDP zu hemmen, würde man eine Verstärkung des Patientenphänotyps erwarten (evtl. nahezu überhaupt keine Verlängerung mehr), im Kontroll-Fibroblastenextrakt dagegen ein patientenähnliches Bild. Infolgedessen wurden zwei Versuche in dieser Hinsicht unternommen:

1. Im Solubilisat aus Kontrolle wie Patient wurde DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrat unter Standardbedingungen mit 1 mM GDP-Man 2 Minuten ohne bzw. in Anwesenheit von 250 und 500 μ M GDP inkubiert.
2. Im Solubilisat aus Kontrollzellen wurde wie oben verfahren, jedoch neben 250 und 500 μ M noch mit 1 mM GDP inkubiert.

In beiden Fällen war hinsichtlich der prozentualen Anteile der einzelnen Zwischenstufen am Gesamtsignal keinerlei Veränderung bzgl. der Kontrolle ersichtlich; jedoch nahm die Signalstärke mit steigenden GDP-Konzentrationen signifikant zu, siehe Abb. III.9. In humanen Zellen ist damit keine der für die Schritte von DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ postulierten vier Mannosyltransferasen durch GDP hemmbar. Andererseits hemmt GDP die offensichtlich auch im Fibroblastensolubilisat aktive LLO-spezifische Pyrophosphatase, die in Hefe von Belard *et al.* (1988) [5] beschrieben worden war. Infolgedessen beinhalteten spätere Experimente 1 mM GDP als Pyrophosphataseschutz.

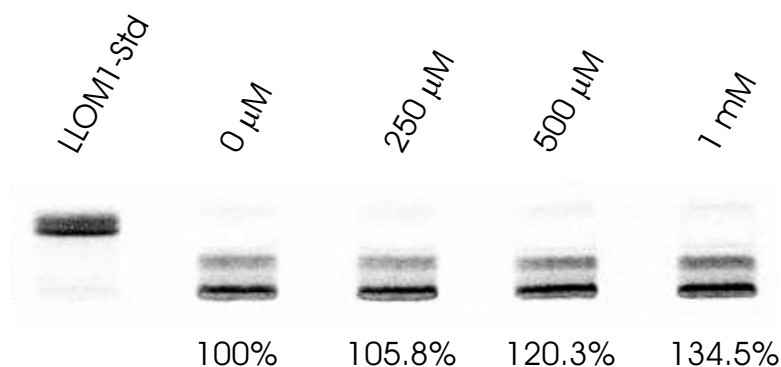


Abbildung III.9: Versuch, die α 1,3-Mannosyltransferase mit GDP zu hemmen. Die Prozentangaben spiegeln die Zunahme der Nettoradioaktivität mit zunehmender GDP-Konzentration wider, die **unabhängig** von den jeweiligen LLO-Intermediaten ist.

Solubilisat aus Kontrollfibroblasten: 2 Minuten GDP-Man-Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ unter Standardbedingungen (A.2.11.7) und unterschiedlichen GDP-Konzentrationen - Dünnschichtchromatographie Silica G60, C/M/H 65:25:4.1. Zu sehen sind die DolPP-GlcNAc₂Man₁-Bande (ganz rechts, das Edukt) sowie DolPP-GlcNAc₂Man₃ und DolPP-GlcNAc₂Man₅ (fast am Ursprung). DolPP-GlcNAc₂Man₄ wird in diesem System nicht vernünftig aufgelöst (Schatten dicht oberhalb DolPP-GlcNAc₂Man₅).

III.4.1.2 Taurocholat-Solubilisierung

Nach Sasak *et al.* (1984) [101] hemmt Taurocholat die α 1,3-Mannosyltransferase. Allerdings wurde in dieser Veröffentlichung nicht beleuchtet, ob im Taurocholat-Solubilisat die anderen Mannosyltransferasen noch aktiv sind. Insofern wurde versucht, durch Solubilisierung von Kontrollfibroblastenmembranen mit unterschiedlich hohen Taurocholat-Konzentrationen *in vitro* DolPP-GlcNAc₂Man₂ aus DolPP-GlcNAc₂Man₁ zu gewinnen (Daten nicht gezeigt).

Nur beim kleinsten Detergens zu Protein-Verhältnis von 1 war überhaupt ein Umsatz zu beobachten, jedoch ohne Akkumulation von Zwischenprodukten: Neben wenig DolPP-GlcNAc₂Man₃ war nur das Endprodukt, DolPP-GlcNAc₂Man₅ deutlich nachweisbar. Höhere Taurocholatkonzentrationen führten zur totalen Inhibierung.

III.4.1.3 Schwermetall-Inhibierung

Eine weitere Strategie zur Anreicherung von LLO-Intermediaten zwischen DolPP-GlcNAc₂Man₁ und DolPP-GlcNAc₂Man₅ war der Versuch, die Enzymaktivität durch Schwermetalle zu hemmen: Soweit bekannt, sind alle GDP-Man abhängigen Mannosyltransferasen auf Mg²⁺ als Kofaktor angewiesen. Unter der Annahme, unterschiedliche Bindungsspezifitäten der einzelnen Enzyme hinsichtlich Magnesium könnten zu unterschiedlichen Sensitivitäten bezüglich zweiwertiger Schwermetalle ähnlicher Ionengröße führen, wurden folgende Experimente in Gegenwart von den üblichen 10 mM MgCl₂ durchgeführt:

10 mM Mn²⁺; Ni²⁺, Zn²⁺ und Cd²⁺ jeweils 5 und 10 mM.

Mangan hemmte nur geringfügig, aber ohne Anreicherung eines spezifischen Intermediates. Alle anderen Schwermetalle inaktivierten schon bei 5 mM alle Transferasen total. Insofern wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

III.4.2 Gewinnung von DolPP-GlcNAc₂Man₂ über Partialverdau von DolPP-GlcNAc₂Man₅ mit *Jack bean* α-Mannosidase

Da es nicht möglich schien *in vitro* in hinreichendem Umfang ein DolPP-GlcNAc₂Man₂-Intermediat zu isolieren, das zur weiteren Aufklärung des Patienten-Defekts unbedingt notwendig war, wurde versucht, DolPP-GlcNAc₂Man₂ durch partiellen Mannosidase-Verdau aus DolPP-GlcNAc₂Man₅ zu gewinnen. Allerdings war unklar, ob die bekannten und kommerziell verfügbaren Mannosidasen auch lipidgebundenes Oligosaccharid spalten. Ein erster Versuch fand ja schon relativ erfolgreich statt, um die Identität von DolPP-GlcNAc₂Man₁ zu bestätigen (vgl. II.4.1). Das hier mit NP40 geringer Konzentration in Lösung gebrachte DolPP-GlcNAc₂Man₁ wurde allerdings deutlich unvollständiger prozessiert als die gleiche Menge freien Oligosaccharids. Entweder hemmte Dolichol an sich, oder aber das Detergens war der Mannosidase abträglich. Doch eventuell wäre es ja möglich, ganz ohne Detergens zu arbeiten und das LLO-Substrat über Ultraschall in Reaktionspuffer zur Dispersion zu bringen. In wässrigem Medium sollten Mizellen mit nach außen gerichteten (hydrophilen) Oligosaccharidresten entstehen und damit zugänglich für die gut löslichen Mannosidasen sein.

Um DolPP-GlcNAc₂Man₅ zu DolPP-GlcNAc₂Man₂ zu prozessieren kamen nun zwei kommerziell erhältliche Enzyme in Frage:

1. α-Mannosidase aus „Jack bean meal“, deren Spezifität im Produktdatenblatt (*Glyko*) als auch in der Originalveröffentlichung zu diesem Enzym der Gruppe um Kobata [112] mit Manα1-2,6>3Man angegeben wurde, sich im Laufe dieser Arbeit, im Einklang mit einer späteren Veröffentlichung der Kobata-Gruppe [126], aber als Manα1-2,3>6Man herausstellte.
2. Eine Mannosidase, die ursprünglich aus *Xanthomonas manihotis* isoliert wurde [123], nun aber rekombinant aus *E. coli* von *Calbiochem* erhältlich ist. Deren Spezifität wird mit Manα1-2,3Man angegeben.

Im Weiteren wurde mit der *Jack bean* α-Mannosidase gearbeitet.

In ersten Versuchen zum Mannosidaseverdau stellte sich heraus, daß dispergiertes LLO bei einer 37°C-Inkubation an die Oberfläche steigt, sich somit von der löslichen Mannosidase trennt. Daher wurde ein Eppendorf Thermo-Mixer mit einer Deckelheizung versehen, die ein Kondensieren

verhinderte (undbedingt notwendig bei einem Reaktionsendvolumen von nur 15 μ l zum Verdau). Andererseits war so ein effektives Durchmischen möglich und die Dispersion blieb erhalten. Um geeignete Bedingungen für die Substratgewinnung zu finden, wurde nun systematisch die Menge an *Jack bean* Mannosidase sowie die Inkubationszeit reduziert. Ein Optimum (überwiegend DolPP-GlcNAc₂Man₂ nach HPLC-Analyse) war erreicht bei 1/4 U/ml und 50 Minuten Inkubation bei 37°C. Je Einzelverdau kamen 40.600 cpm LLO[³H]Man₅-Substrat zum Einsatz, das aus *in vivo*-[³H]Man-Markierung von Hefe *alg3*-Mutanten (A.2.7) gewonnen worden war.

III.4.3 Nachweis der Identität des aus *Jack bean* α -Mannosidaseverdau gewonnenen DolPP-GlcNAc₂Man₂ als DolPP-GlcNAc₂ β 1,4Man- α 1,6Man

Bei dem aus *Jack bean* Mannosidaseverdau von DolPP-GlcNAc₂Man₅ gewonnenen DolPP-GlcNAc₂Man₂ könnte es sich entweder um Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc₂-PPDol oder aber um Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc₂-PPDol handeln. Nach Angaben des Herstellers sowie der dort zitierten Veröffentlichung von Tadashi *et al.* [112] war ersteres anzunehmen. Zur Überprüfung der Iden-

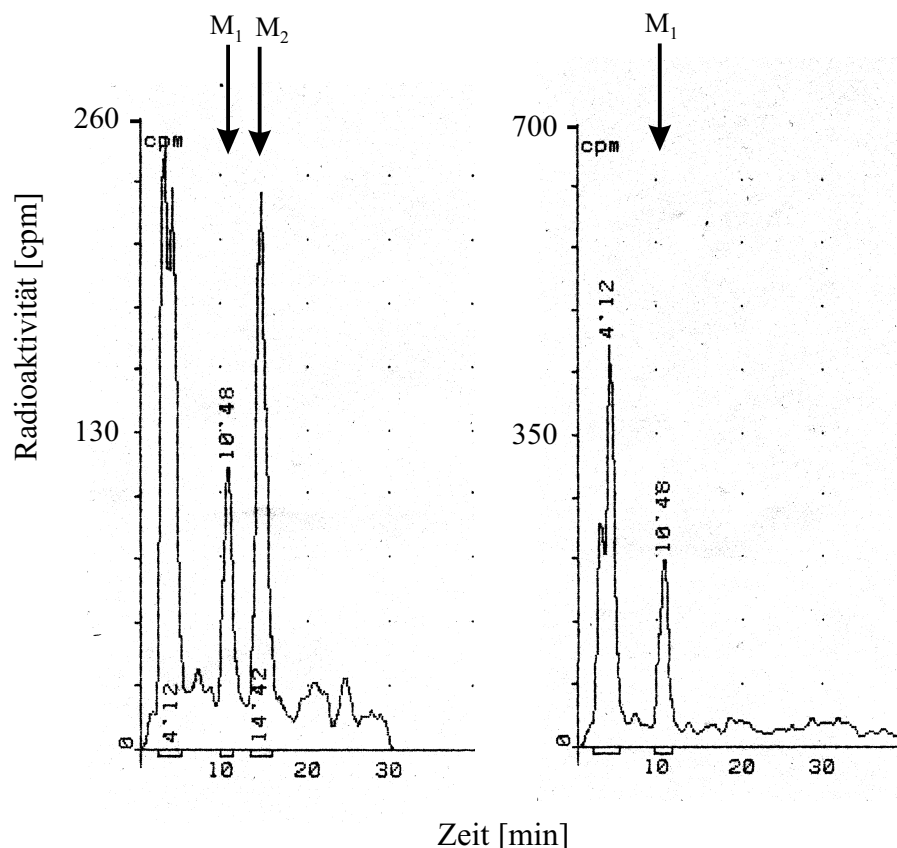


Abbildung III.10: Analytischer Verdau des DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrats aus *Jack bean* Mannosidase-Verdau nach Hydrolyse:

Links: Verdau mit α 1-2,3-spezifischer Mannosidase; rechts: Verdau mit α 1,6-spezifischer Mannosidase. Jeweils HPLC-Elutionsprofile, M₁ = GlcNAc₂Man₁, M₂ = GlcNAc₂Man₂.

Das Profil links entspricht genau dem Profil unverdauten GlcNAc₂Man₂, das bei dieser Präparation auch etwas GlcNAc₂Man₁ enthielt.

tität wurde DolPP-GlcNAc₂Man₂ mildsauer hydrolysiert.

Die eine Hälfte wurde mit einer Man α 1-2,3Man spezifischen Mannosidase aus *Xanthomonas manihotis* [123] verdaut (*Calbiochem*). Deren Aktivität bzgl. der Man α 1-3Man-Bindung war vorher überprüft worden. Der Verdau erfolgte mit 10 U Mannosidase (5 μ l Enzym wie geliefert) 24 h bei 37°C (Abb. III.10, links). Näheres zur Methodik ist unter A.2.8.2 beschrieben.

Die andere Hälfte wurde mit einer ebenfalls aus *Xanthomonas manihotis* stammenden [123] Man α 1-6Man-spezifischen Mannosidase (*Calbiochem*) verdaut (1.125 mU Enzym bei 37°C 3.5 h, siehe A.2.8.3): Abb. III.10, rechts.

Wie aus den HPLC-Analysen beider Verdaue in Abb. III.10 ersichtlich, handelt es sich also bei der zweiten Mannose des vorliegenden DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrats um die α 1,6-, nicht wie erwünscht und erwartet die α 1,3-Verknüpfung.

Die hier gefundene, von der Produktbeschreibung abweichende, Spezifität des Enzyms wird durch eine zweite Veröffentlichung der Gruppe um Kobata bestätigt [126].

III.5 Ein neuer CDG-Fall, Subtyp II: Identifizierung und biochemische Charakterisierung als Defekt im humanen *ALG2* Gen

III.5.1 Im Enzymsolubilisat aus Patientenzellen ist die Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ zu DolPP-GlcNAc₂Man₂ defekt

Nachdem bereits aus den vorangegangenen Experimenten ein Defekt im Schritt von DolPP-GlcNAc₂Man₁ nach DolPP-GlcNAc₂Man₂ wahrscheinlich erschien (Dünnschichtchromatographien, siehe Abb. III.8), erfolgte eine bestätigende HPLC-Analyse - wegen der besseren Trennleistung. Solubilisat aus Kontroll- und Patientenzellen wurde nach Standardmethoden A.2.11.7 gewonnen und mit GDP-Man sowie DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁ umgesetzt. Die Aufarbeitung (A.2.11.9) sowie HPLC-Analyse (A.3.1) erfolgte wie im Methodenteil vermerkt. Aus Abb. III.11 geht klar hervor, daß die Reaktion von DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ im Solubilisat aus Membranen von Kontrollzellen innerhalb von nur 4 Minuten nahezu quantitativ abläuft. Dabei sind bei 2 Minuten alle Intermediate von DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ präsent, besonders dominant DolPP-GlcNAc₂Man₃ (wie auch schon in den Dünnschichtchromatographien Abb. III.6 und III.8). Ganz anders im Patienten-Solubilisat, wo selbst nach 4 Minuten nicht mehr als eine Andeutung von Man₅-Oligosaccharid zu detektieren ist – ohne daß dabei Intermediate gleich welcher Art auftreten. Folglich muß im Patienten der Schritt von DolPP-GlcNAc₂Man₁ nach DolPP-GlcNAc₂Man₂ betroffen sein. Folgerichtig sind auch keine Intermediate nachzuweisen, da die nachfolgenden, in normaler Geschwindigkeit ablaufenden Reaktionen keine Anhäufung von Zwischenstufen zulassen. Dagegen verläuft die Reaktion von DolPP-GlcNAc₂ nach DolPP-GlcNAc₂Man₁ völlig normal (siehe III.5.3).

III.5.2 Das defekte Patientengen ist das humane Ortholog zum *ALG2* aus *Saccharomyces cerevisiae*

Untersuchungen von Thiel und Körner zufolge, die zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen in [114] veröffentlicht sind, war nach metabolischer Markierung mit [³H]Man auch eine, allerdings deutlich untergeordnete, Akkumulation von DolPP-GlcNAc₂Man₂ *in vivo* zu beobachten,

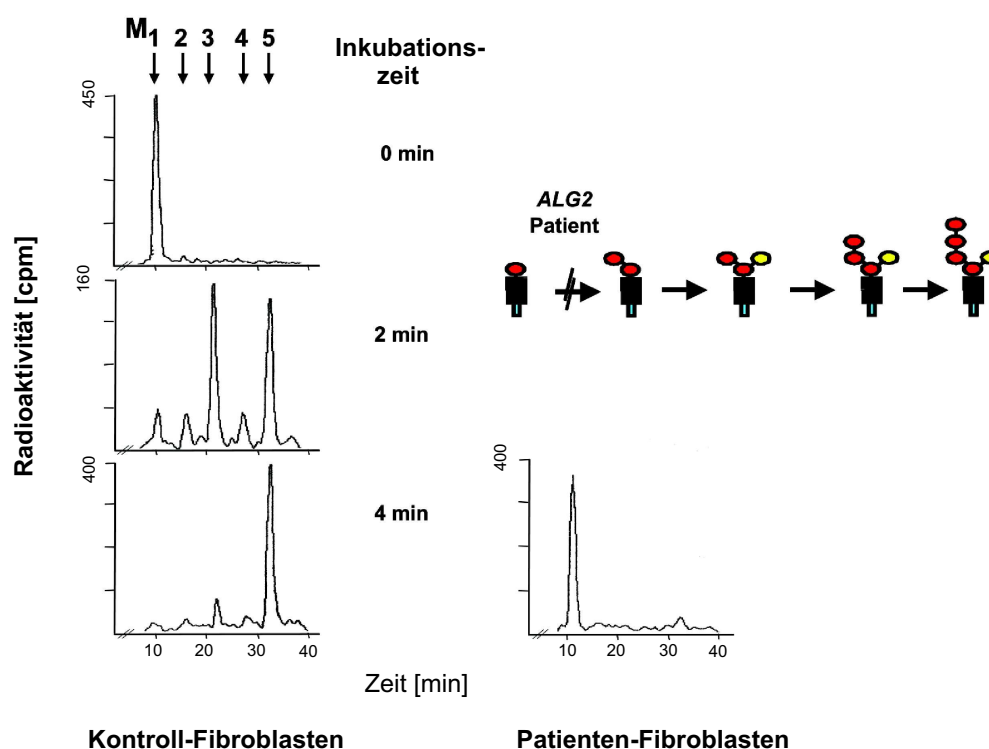
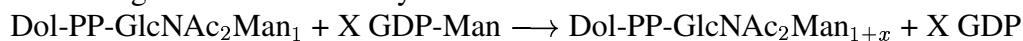


Abbildung III.11: *In vitro* assay:



HPLC-Profil; links: Kinetik mit Kontrollfibroblasten-Solubilisat von 0 bis 4 Minuten; rechts: Patientenfibroblasten-Solubilisat 4 Minuten Reaktion, sowie schematische Darstellung der Reaktionsfolge bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ mit Kennzeichnung des Patientendefekts.

die *in vitro* nicht zu bestätigen war (vgl. Abb. III.11). Dies erinnerte an den Phänotyp der *alg2-1*-Mutante bei *S. cerevisiae* (vgl. Abb. III.14) [42]. Bei Überprüfung des Genotyps des Patienten zeigte sich in der Tat, daß Mutationen im präsumptiven humanen *ALG2* Ortholog nachzuweisen sind: Das väterliche Allel des Patienten wies eine Substitutionsmutation auf (G393T), was instabile Transkripte zur Folge hat, das mütterliche Allel war mit einer Einzelnukleotiddeletion behaftet (Δ 1040G), was zu einem Frameshift führt, die Stabilität der m-RNA aber unberührt läßt [114]. Infolgedessen schien es wichtig zu überprüfen, ob die aufgrund von Sequenzähnlichkeiten verbunden mit dem *alg2-1*-ähnlichen Phänotyp postulierte Orthologie tatsächlich gegeben ist. Daher wurde sowohl die cDNA des potentiellen h*ALG2* als auch die des mütterlichen Allels (Δ 1040G) in einen Hefe Shuttle-Vektor unter Kontrolle des *PMA1*-Promotors kloniert und jeweils, wie auch der leere Vektor, in die *S. cerevisiae alg2-1*-Mutante transformiert (A.4.4). In den Abb. III.12 und III.13 sind die an den transformierten Stämmen gemachten Untersuchungen zusammengefaßt. Zunächst wurde der *in vivo*-Pool an lipidgebundenen Oligosacchariden analysiert. Nach 30 Minuten metabolischer Markierung mit [2-³H]Mannose wurden die kurzkettigen, relativ unpolaren LLOs mit CHCl₃/CH₃OH, die länger-kettigen mit CHCl₃/CH₃OH/H₂O extrahiert (A.2.7). Durch mildsaure Hydrolyse wurden die Oligosaccharide vom Dolicholrest abgespalten (A.2.11.9) und

über HPLC aufgetrennt (A.3.1). Wie aus Abb. III.12 ersichtlich, ist der C/M-Extrakt der *alg2-1*-Mutante transformiert mit dem humanen *ALG2*-Homolog (hWt) aus Kontrollzellen praktisch frei von kurzkettigen LLOs. Anders dagegen der mit dem humanen $\Delta 1040G$ *ALG2*-Homolog aus Patientenzellen (hPat) transformierte Klon: Hier sind ein deutlicher Peak an der Position des GlcNAc₂Man₁-Standards sowie evtl. eine marginale Fraktion von GlcNAc₂Man₂ zu beobachten.

Damit im Einklang die HPLC-Profile der C/M/H-Extraktion (Abb. III.13 oben). Bei Expressi-

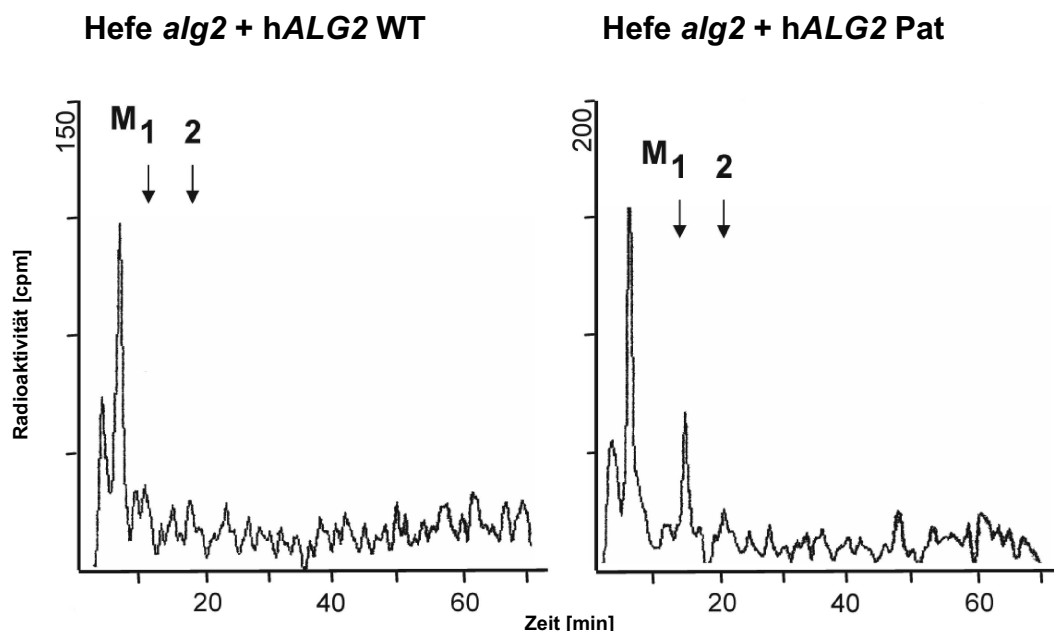


Abbildung III.12: Komplementation der *alg2-1* Hefemutante mit Patientengen und humanem Kontrollgen: C/M-LLO-Extrakt

Siehe Untertext der Abb. III.13 zur weitergehenden Erläuterung

on des humanen Kontrollgens in *alg2-1* findet sich die für den LLO-Pool des Endoplasmatischen Reticulums charakteristische Verteilung. Die Zellen mit humanem Patientengen hingegen zeigen praktisch keine länger-kettigen Oligosaccharide, dagegen ungewöhnlich viel an Tri- und Tetrasaccharid (M₁ bzw. M₂).

Eine weitere Untersuchung galt dem Wachstumsverhalten der mit hWt, hPat bzw. dem leeren Vektor transformierten *alg2-1*-Klone. *alg2-1* zeigt einen deutlichen Wachstumsphänotyp bei 30°C, wächst aber annähernd normal bei der permissiven Temperatur (25°C). In Abb. III.13 Mitte ist die bei 30°C besonders deutliche Komplementation des Wachstumsphänotyps durch das humane Homolog aus Kontrollzellen klar erkennbar. Dagegen zeigt sich das humane Homolog des Patienten ebenso wirkungslos wie der Vektor.

Zuletzt wurde noch die proteingebundene Glykosylierung der vorgestellten drei Klone analysiert. Dazu wurde die Carboxypeptidase Y (CPY) untersucht. Die CPY der Hefe ist eine vakuoläre Serinprotease und wird vom *PRC1*-Gen kodiert [115]. Sie ist ein Glykoprotein und verfügt über vier N-Glykosylierungsstellen. Aufgrund einer 2 kDa großen Signalsequenz erfolgt die Translokation in das ER. Die Präproform der CPY besitzt ein Molekulargewicht von 59.5 kDa. Im ER erfolgt nach Abspaltung der Signalsequenz die core-Glykosylierung, aus der dann die 67 kDa p1-Form hervorgeht. Die weitere Prozessierung der vier core-Ketten des Proteins beginnt noch im ER und wird nach dem Transport in den Golgi-Apparat dort fortgesetzt. So entsteht zunächst die p2-Form mit 69 kDa, die dann durch Abspaltung der 8 kDa großen Prosequenz in die reife, proteolytisch

aktive m-Form mit 61 kDa übergeht.

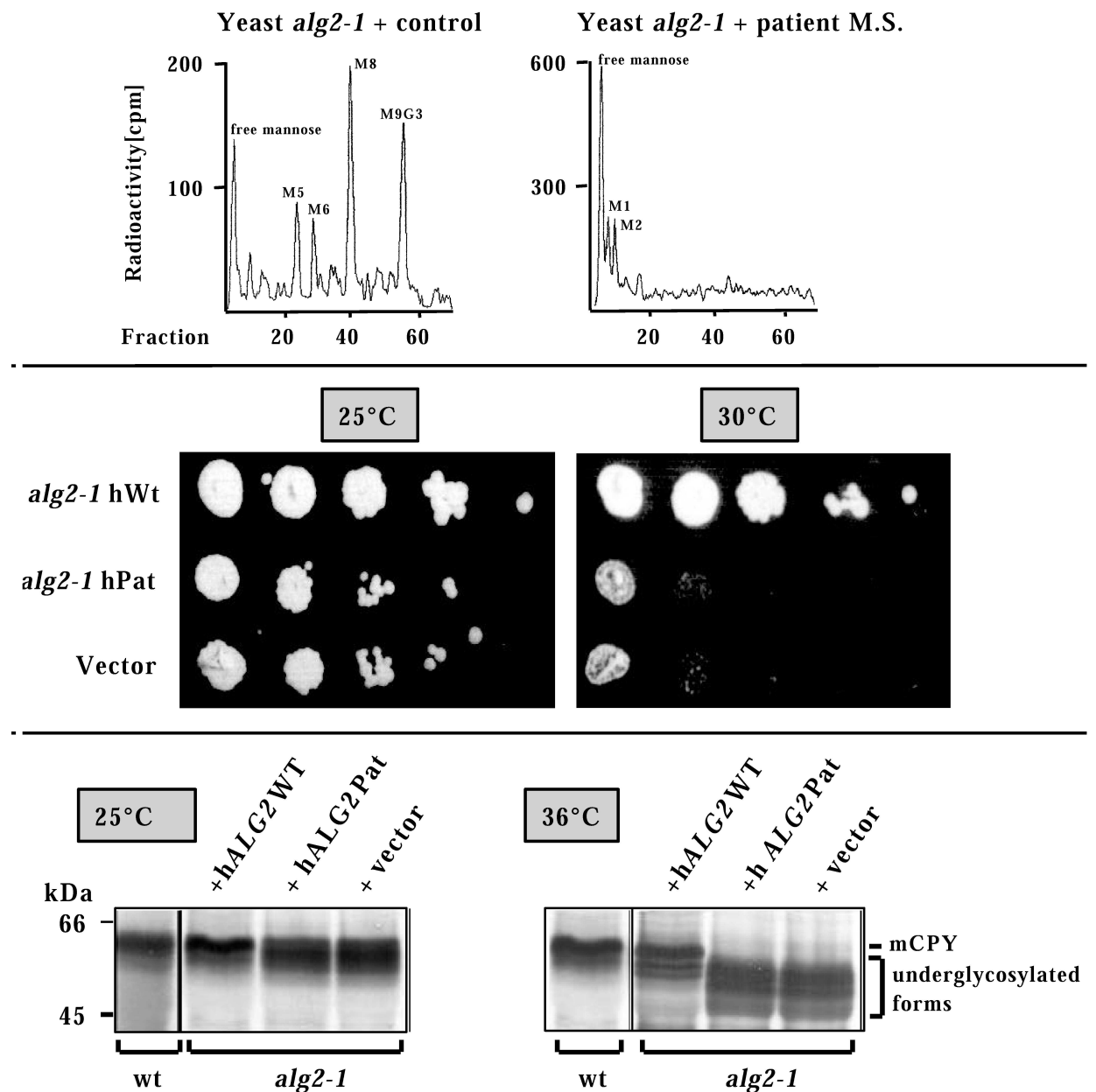


Abbildung III.13: Komplementation der *alg2-1* Hefemutante mit Patientengen und humanem Kontrollgen

HPLC-Profil: **Abb. III.12** C/M-, **diese Abb. oben** C/M/H-Extrakte nach metabolischer Markierung mit ^3H -Man. Nach mildsaurer Hydrolyse erfolgte die Auftrennung via HPLC nach Standardmethoden. $\text{M}_x(\text{G}_3)$ beziehen sich auf die Oligosaccharid-Standards $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_x(\text{G}_3)$. **Mitte:** Wachstum von *S. cerevisiae* *alg2-1*-Zellen, transformiert mit dem Vektor, dem humanen Kontrollgen (hWt) oder dem Patientengen (hPat) bei permissiver (25°C) oder restriktiver (30°C) Temperatur. **Unten:** Glykosylierungsstatus der Carboxypeptidase Y bei permissiver (25°C) und restriktiver (36°C) Temperatur. Metabolische Markierung mit ^{35}S -Methionin (30 min), Immunpräzipitation und SDS-PAGE; die Position der mCPY im Wildtyp (mCPY) sowie die unterglykosylierten Formen sind rechts vermerkt.

Dem untersten Teil der Abb. III.13 kann nun die Glykosylierung der CPY aller drei Klone entnommen werden: Nach *in vivo*-Markierung mit [35 S]-Methionin, durchgeführt bei permissiver (25°C) als auch restriktiver (36°C) Temperatur und Immunpräzipitation (A.2.9) erfolgte die Auftrennung via 8 % SDS-PAGE. Bei permissiver Temperatur zeigen praktisch alle untersuchten Klone noch die beim WT dominante 61 kDa Bande, wenngleich bereits unterglykosylierte Formen bei den mit Vektor und hPat transformierten Klonen zu erkennen sind. Bei 36°C fehlt dann bei den Letztgenannten die 61 kDa Bande, die der mit vier N-gebundenen Oligosaccharidketten vollständig glykosylierten CPY entspricht, völlig. Vorhanden sind die -1, -2 und -3-Formen sowie das völlig unglykosylierte Protein. Dagegen besteht die Hauptfraktion der aus dem mit hWt transformierten Klon isolierten CPY aus der vollständig glykosylierten Form mit etwa 61 kDa. Leichtere (-1 und -2) Formen sind nur in geringem Ausmaß vorhanden.

Aus der Untersuchung der LLO-Pools, des Wachstumsphänotyps und der CPY-Glykosylierung der mit dem Vektor, hWt bzw. hPat transformierten Klone muß folglich von einer Komplementation des Defekts der Hefe *alg2-1*-Mutante durch das humane Kontrollgen, nicht jedoch durch das Patientengen ausgegangen werden. Das defekte Gen im untersuchten Patienten ist also in der Tat das Ortholog zum *S. cerevisiae* ALG2 und der Defekt ursächlich für den biochemisch beobachteten Glykosylierungsphänotyp.

In Abb. III.14 ist der von Robbins *et al.* ermittelte biochemische Phänotyp für die *S. cerevisiae* *alg2-1*-Mutante dargestellt. Nach mildsaurer Hydrolyse waren die [3 H]Man-markierten Oligosaccharide auf einer Bio-Gel P4-Säule getrennt worden [42]. Daneben ein Schema, das die mögliche Reaktionsabfolge sowie die mögliche Funktionalität von Alg2p (und damit den Block in der Prozessierung, dargestellt mit durchgestrichenem Pfeil) skizziert. Wie zu ersehen, ist es bisher unklar, wie es zur Akkumulation von überwiegend DolPP-GlcNAc₂Man₁, daneben aber auch einer signifikanten Population von DolPP-GlcNAc₂Man₂ kommt. In dieser wie einer früheren Veröffentlichung zur *alg2*-Mutante [38] werden sich widersprechende Hypothesen ins Feld geführt, von denen jedoch keine mit den bisherigen experimentellen Daten zu widerlegen war. Mit dem etablierten *in vitro* Test und einem definierten DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrat sollte daher versucht werden, Klarheit zu gewinnen.

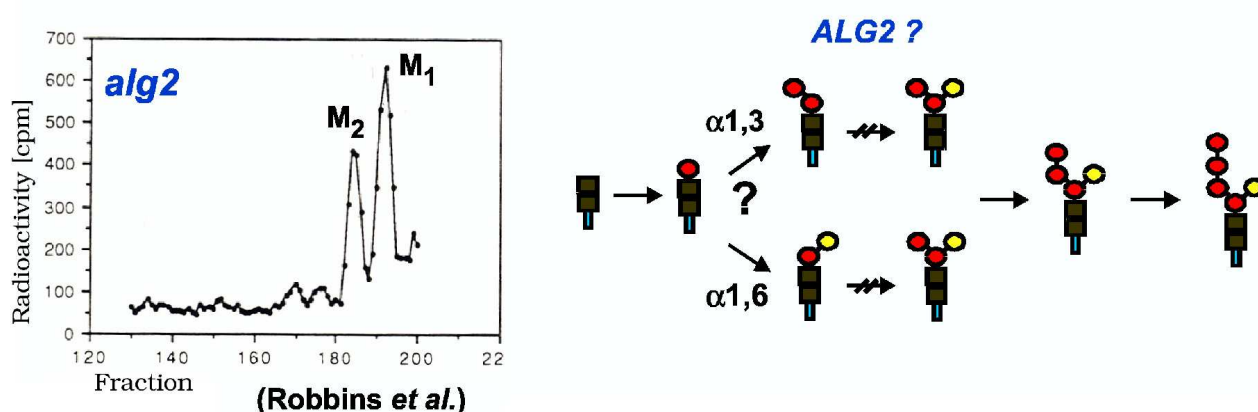


Abbildung III.14: Der biochemische Phänotyp von *S. cerevisiae* *alg2-1* nach Robbins *et al.* [42]: Nach wie vor bleibt unklar, für welche Transferaseaktivität Alg2p steht. Auch die enzymatische Abfolge liegt im Dunkel: α 1,3Man vor α 1,6Man, oder umgekehrt?

III.5.3 Im Solubilisat aus Fibroblasten mit einem defekten humanen *ALG2* ist die α 1,3-Mannosyltransferase betroffen

Das, wie unter III.4.2 dargestellt, enzymatisch gewonnene DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrat, dessen Identität unter III.10 als DolPP-GlcNAc₂ β 1,4Man α 1,6Man ermittelt worden war, wurde nun als Substrat in einer Elongationsreaktion eingesetzt. Im Solubilisat aus Kontroll- sowie Patientenfibroblasten (A.2.11.7) wurden ca. 7.000 cpm LLO[³H]Man₂-Substrat mit 1 mM GDP-Man inkubiert. Zu jeweils 4 und 10 Minuten wurde die Reaktion gestoppt, aufgearbeitet und über HPLC analysiert. Um sicher zu gehen, daß prinzipiell auch das Patienten-Solubilisat Transferaseaktivitäten aufweist, nur eben nicht in der hier spezifisch getesteten Reaktion, wurde auch ein Aliquot Patienten- wie Kontrollsolubilisat mit DolPP-GlcNAc₂ und 1 mM GDP-Man unter sonst gleichen Bedingungen getestet. Nach 12 Minuten war im Patientensolubilisat eine praktisch quantitative Elongation zu DolPP-GlcNAc₂Man₁ erfolgt, mit nur geringem Anteil längerkettiger LLOs, im Kontrollsolubilisat hingegen war der überwiegende Anteil bereits zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ umgesetzt worden. Dies bestätigt sowohl die Funktionalität des Solubilisats, als auch der β 1,4-Mannosyltransferase des Patienten (keine Abb.).

In Abb. III.15 ist nur die 10 Minuten-Reaktion dargestellt, da hier die Unterschiede zwischen Kontrolle und Patient am deutlichsten hervortreten. Nach vier Minuten Reaktion überwiegt in der Kontrolle der M₃-Peak noch deutlich gegenüber dem M₅-Peak (M₂ : M₃ : M₅ etwa 4.7 : 3 : 1), was in dieser Art bereits in einem unabhängigen Vorexperiment mit einer anderen Charge DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrats zu beobachten war.

In der Kontrolle findet also eine Verlängerung des angebotenen Substrats statt, ganz im Gegensatz zum Patienten, wo nur zwei marginale Peaks an der M₃- sowie der M₅-Position von einer minimalen Restaktivität zeugen. Vergleicht man allerdings den zeitlichen Ablauf der Reaktion mit der Verlängerung des DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrats in Abb. III.11, wo nach 4 Minuten die Reaktion quasi abgeschlossen war, so fällt der deutlich langsamere Umsatz des hier angebotenen DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrats auf. Unter der Prämisse, daß sich die α 1,3-Mannosyltransferaseaktivität und die α 1,6-Mannosyltransferaseaktivität in zwei distinkten Proteinen manifestieren, codiert von je einem eigenständigen Gen, lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Aufgrund der Ergebnisse aus der Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂, die im Patienten bei DolPP-GlcNAc₂Man₁ zum Stillstand kommt, wie auch den analogen Ergebnissen mit dem DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrat, das weitgehend nicht umgesetzt wird (vgl. Abb. III.11), muß ein Defekt bereits in der ersten Transferasereaktion im Anschluß an die β 1,4-Mannoseübertragung angenommen werden.
2. Der Patient ist mit großer Wahrscheinlichkeit *ausschließlich* in der ersten Transferasereaktion nach β 1,4-Man defekt: Eine „leakyness“ im *h-alg2*-Defekt, wie in Abb. III.8 zu erkennen, führt sehr wohl im Laufe der Zeit zur Bildung von DolPP-GlcNAc₂Man₅, wenngleich sehr viel langsamer als in der Kontrolle. Dabei sind, neben dem Substrat, DolPP-GlcNAc₂Man₁, und dem Endprodukt, DolPP-GlcNAc₂Man₅, praktisch keine Zwischenstufen in bedeutsamen Mengen vorhanden. Daraus allerdings muß gefolgert werden, daß alle Reaktionen in normaler Geschwindigkeit ablaufen – außer der Mannosyltransferasereaktion zu DolPP-GlcNAc₂Man₂. Wäre beispielsweise auch die folgende Transferase von DolPP-GlcNAc₂Man₂ nach DolPP-GlcNAc₂Man₃ in ernster Weise betroffen, würde man eine Akkumulation von DolPP-GlcNAc₂Man₂ erwarten, jedenfalls deutlich mehr DolPP-GlcNAc₂Man₂-Intermediat als DolPP-GlcNAc₂Man₃, da dieses Intermediat dann mit Nor-

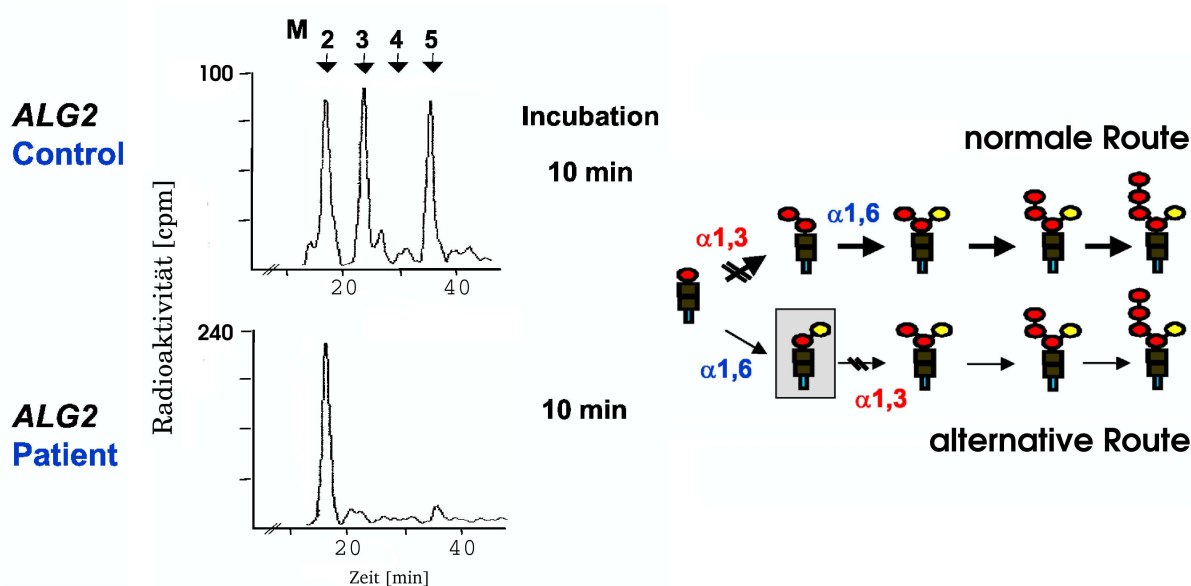


Abbildung III.15: *In vitro* assay mit aus DolPP-GlcNAc₂Man₅ durch enzymatischen Abbau gewonnenem DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrat:



Links die HPLC-Profile, rechts die für das angebotene Substrat vorgeschlagene „alternative Route“. Der Block im Patienten aufgrund des *h-alg2*-Defekts ist in beiden Routen jeweils mit einem durchgestrichenen Pfeil gekennzeichnet, das angebotene Substrat mit der grau schattierten Box hervorgehoben.

malgeschwindigkeit, ohne sich anreichern zu können, sofort umgesetzt würde. Dies ist jedoch weder in Abb. III.8 (siehe Quantifizierung), noch in Abb. III.11 zu erkennen.

3. Aus der Unfähigkeit des Patientensolubilisats, das eingesetzte DolPP-GlcNAc₂β1,4Manα1,6Man-Substrat zu verlängern, muß nun auf einen α1,3-Mannosyltransferasedefekt geschlossen werden. Das *ALG2*-Gen muß also die α1,3-Mannosyltransferaseaktivität codieren.
4. Die Tatsache einerseits, daß der Patient trotz Punkt (2) zumindest *in vitro* ausschließlich DolPP-GlcNAc₂Man₁ akkumuliert und andererseits der Umsatz des angebotenen DolPP-GlcNAc₂β1,4Manα1,6Man-Substrats in der Kontrolle ungewöhnlich langsam vonstatten geht, läßt einen weiteren Schluß zu:

Die natürliche Abfolge der Reaktionen besteht in der Elongation des DolPP-GlcNAc₂Man₁-Intermediates zunächst durch die α1,3-Mannosyltransferase und erst im Anschluß die α1,6-Mannosyltransferase. Damit stellt das hier eingesetzte Substrat, DolPP-GlcNAc₂β1,4Manα1,6Man ein unnatürliches Substrat dar, das quasi über einen „Seiteneingang“ von der α1,3-Transferase zwar zum Trimannosid umgesetzt wird, jedoch ungleich langsamer als deren natürliches DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrat, das zum Dimannosid umzusetzen ihre „normale“ Aufgabe ist (vgl. Abb. III.15, Schema rechts). Diese große Flexibilität hinsichtlich des Substrats scheint die α1,6-Transferase bezüglich des in großem Überschuß vorhandenen DolPP-GlcNAc₂Man₁-Substrats nicht an den Tag zu legen. Allerdings kann der im *in vivo* LLO-Pool sowohl beim Patienten als auch in der *S. cerevisiae alg2-1*-Mutante beobachtete, mengenmäßig hinter DolPP-GlcNAc₂Man₁ zurücktretende, Anteil DolPP-GlcNAc₂Man₂

(vgl. Abb. III.14) auf einen geringen Umsatz von unnatürlich hoch akkumuliertem DolPP-GlcNAc₂Man₁ durch die α 1,6-Mannosyltransferase zurückzuführen sein. Deren Substratspezifität wäre mithin auch nicht völlig kompromißlos. Da einerseits die α 1,3-Mannosyltransferase in beiden Fällen ohnehin weitgehend defekt ist, andererseits DolPP-GlcNAc₂ β 1,4Man- α 1,6Man für diese Transferase ein deutlich schlechteres Substrat darstellt als DolPP-GlcNAc₂Man₁ (vgl. Abb. III.15), bleibt das so in Patient wie Hefemutante gebildete DolPP-GlcNAc₂ β 1,4Man α 1,6Man unprozessiert in dieser „Sackgasse“ liegen.

Damit wären nun zwei Fragen geklärt:

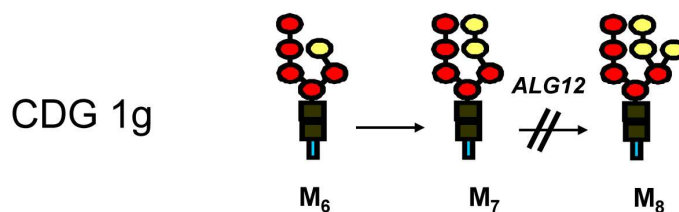
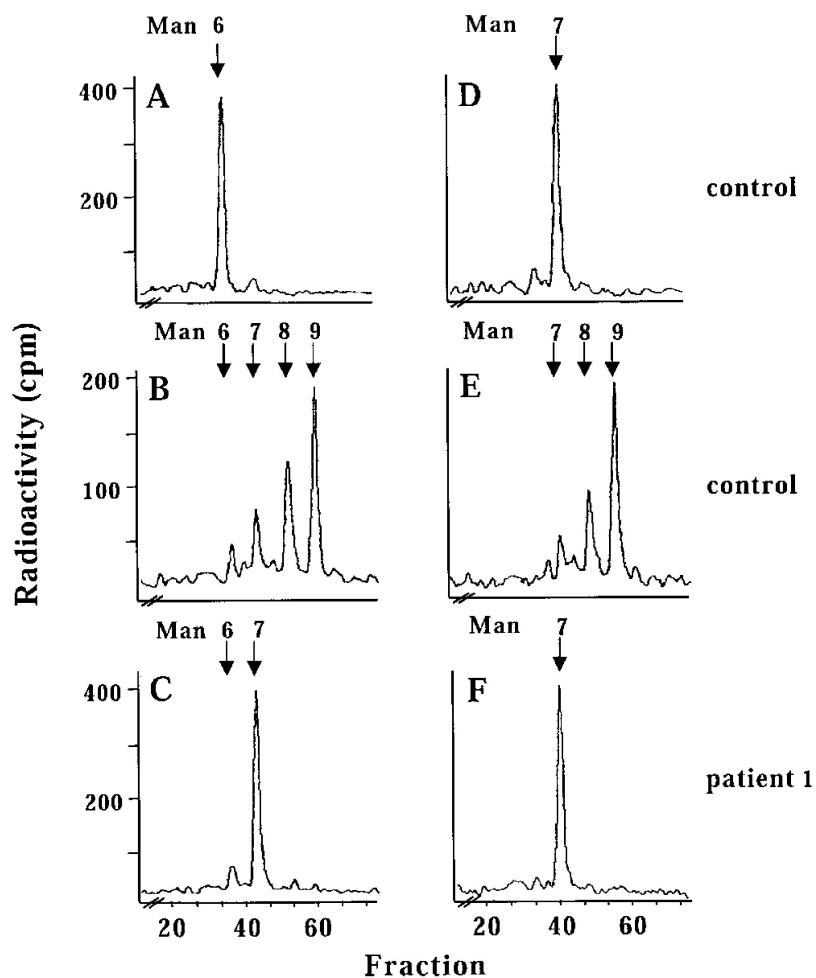
Einmal verkörpert Alg2p die α 1,3-Transferaseaktivität, was bislang völlig unklar war.

Desweiteren ist, zumindest was den Menschen angeht, die Reaktionsabfolge an der Verzweigungsstelle im „Zuckerbaum“ geklärt: Die Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂Man₁ geschieht zunächst durch die α 1,3-gebundene Mannose, erst im Anschluß daran durch die α 1,6-gebundene.

III.6 CDG Ig: Identifizierung eines neuen CDG-Subtyps mit einem Defekt im humanen Alg12p

Ein aufgrund des typischen multisystemischen Krankheitsbildes sowie des Glykosylierungsmusters von Serumtransferrin als CDG-Fall eingestufte Patient wies Untersuchungen von Thiel und Körner zufolge eine Akkumulation von DolPP-GlcNAc₂Man₇ auf [113]. Daher bestand der Verdacht auf einen Defekt im humanen Homolog zum *Saccharomyces cerevisiae* Alg12p, einer α 1,6-Mannosyltransferase, die auf der luminalen ER-Seite DolPP-GlcNAc₂Man₇ nach DolPP-GlcNAc₂Man₈ prozessiert und auf DolP-Man als Donorsubstrat angewiesen ist.

Ausgehend von einem für das Hefeenzym entwickelten Test für die Verlängerung von [³H]Man markierten LLOs ab DolPP-GlcNAc₂Man₅ aufwärts, wurden die Bedingungen für Fibroblasten angepaßt. So zeigte sich, daß Solubilisat (NP40/P = 2.647 nmol/ μ g) zwar Aktivität aufweist und LLO[³H]M₆ als Edukt partiell bis DolPP-GlcNAc₂Man₉ verlängert wird, jedoch bei weitem nicht quantitativ. Im Gegensatz zu Hefe waren im Falle von Fibroblasten Membranen ungleich aktiver als das Solubilisat. Deshalb wurde lediglich die erforderliche Menge NP40 eingesetzt, um das LLO-Substrat und DolP-Man in Lösung zu bringen und die Reaktion mit einer Rohmembranfraktion aus Fibroblasten durchgeführt (siehe A.2.11.9). Als Akzeptorsubstrat wurden jeweils 40.000 cpm DolPP-GlcNAc₂Man₆ bzw. DolPP-GlcNAc₂Man₇ eingesetzt, isoliert aus einer Δ alg9 bzw. Δ alg12 Hefemutante nach metabolischer Markierung mit [³H]Mannose (siehe A.2.7). Das Donorsubstrat war kaltes DolP-Man (ca. 1 μ M). Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 150 μ g Membranprotein gestartet und bei 24°C 20 Minuten inkubiert. Als Kontrolle diente für jedes Akzeptorsubstrat ein Ansatz ohne Donorsubstrat (DolP-Man) mit Kontrollmembranen (in Abb. III.16 oben A und D). Wie Teil B und E aus Abb. III.16 oben zu entnehmen ist, wurde in Kontrollmembranen sowohl DolPP-GlcNAc₂Man₆ (B) als auch DolPP-GlcNAc₂Man₇ (E) effektiv zu DolPP-GlcNAc₂Man₉ verlängert. Patientenmembranen sind zwar in der Lage, DolPP-GlcNAc₂Man₆ nach DolPP-GlcNAc₂Man₇ zu verlängern (C), bei DolPP-GlcNAc₂Man₇ jedoch bleibt die Reaktion stehen (C und F). Der Defekt liegt folglich in der nachfolgenden Transferase begründet, dem humanen Homolog zum *S. cerevisiae* Alg12p.



**Verlängerung bis DolPPGlcNAc₂Man₇,
aber nicht darüber hinaus**

Abbildung III.16: Dolichyl-P-Man:Man₇GlcNAc₂-PP-Dol Mannosyltransferase-Aktivität: *In vitro* assay mit LLO[³H]M₆ bzw. LLO[³H]M₇ und kaltem DolPMan

Dol-PP-GlcNAc₂Man_{6/7} + X DolP-Man → Dol-PP-GlcNAc₂Man_{6/7+x} + X DolP

oben: In A bzw. D wurden Kontrollmembranen und LLO-Substrat ohne DolPMan 20 Minuten bei 24°C inkubiert (control). In B und C wurde DolPP-GlcNAc₂Man₆, in E und F DolPP-GlcNAc₂Man₇ in Kontroll- bzw. Patientenmembranen mit DolPMan 20 Minuten bei 24°C umgesetzt.

unten: CDG-Subtyp Ig. Ursache ist ein Defekt in der α1,6-Mannosyltransferase (humanes Homolog zum *S. cerevisiae* Alg12p), die im Ganzen gesehen die achte Mannose, bzw. die dritte, von Dol-P-Man stammende Mannose, als Verzweigung auf den β1,4Manα1,6Man-„Ast“ überträgt. Die cytoplasmatisch mit GDP-Man als Donor übertragenen Mannosen sind rot, die luminal, vom Donor Dol-P-Man stammenden Mannosen gelb dargestellt.

Wie von Thiel/Körner in Kooperation nachgewiesen [113], besteht in der Tat ein Defekt im entsprechenden Gen des Patienten: Im mütterlichen Allel liegt eine Transition von T473C vor, was zu einer Substitution von Leucin 158 zu Prolin führt, im väterlichen Allel eine Transversion von C1242G, die Tyr 414 in ein Stopp-Codon überführt, so daß die 74 C-terminalen Aminosäuren fehlen. In Abb. III.16 *unten* ist der hiermit beschriebene CDG-Subtyp Ig noch einmal zusammengefaßt.

Kapitel IV

Weitere Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung unbekannter humaner Glykosylierungsdefekte (CDGs)

IV.1 Grundsätzliche Parameter und Vorgehensweisen

Um die oben beschriebenen Enzymtests für humane Fibroblasten aufzubauen, mußten zunächst sowohl die Methodik von Zellernte und Zellaufschluß optimiert als auch die Zellkulturbedingungen in geeigneter Weise standardisiert werden. Im Folgenden soll kurz auf die wichtigsten Punkte eingegangen werden.

IV.1.1 Optimierung von Zellernte und Zellaufschluß

Wenn die durch Anwendung von Trypsin von der Unterlage gelösten Fibroblasten nicht pelletiert wurden, sondern in 35 % Glycerin enthaltenden Tris-Puffer pH 7.4 - 7.5 mit Proteaseinhibitoren (der hohe Glyceringehalt verursacht bereits teilweise Permeabilisierung) bei -80°C bis zum Zellaufschluß und der Membranpräparation eingefroren wurden, konnten deutlich höhere Enzymaktivitäten insbesondere im Falle der GlcNAc-Transferasen erzielt werden. Noch besser war das Ergebnis, wenn die so geernteten Zellen in flüssigem N₂ „schockgefrostet“ und dann bei -80 gelagert wurden – dem fortan beibehaltenen Standardverfahren.

Zum Zellaufschluß kam zunächst gepulster Ultraschall zum Einsatz. Hinsichtlich der OST-Aktivität war dieses Verfahren unproblematisch, die empfindlicheren GlcNAcP/GlcNAc-Transferasen jedoch wiesen von Aufschluß zu Aufschluß größere Aktivitätsschwankungen auf. Infolgedessen wurde ein auf hypertonischem/hypotonischem Pufferwechsel basierendes Aufschlußverfahren entwickelt und aufgrund seiner guten Reproduzierbarkeit beibehalten (vergleiche A.2.3).

IV.1.2 Abhängigkeit der OST-, der GPT- sowie der GNT-Aktivität von der Zellkulturdauer und Festlegung der methodischen Parameter

In Abhängigkeit vom Zustand der Zellen zur Zeit der Zellernte war eine gewisse Variabilität in für die N-Glykosylierung relevanten Enzymaktivitäten nicht auszuschließen. Dies würde insbesondere große Unsicherheiten bezüglich der Diagnose enzymatischer Defekte minderen Ausmaßes aufwerfen, die ja allein auf den Vergleich zu Referenzexperimenten mit Kontrollzellen beruhen. Deshalb

wurden für die Glykosylierung entscheidende Enzyme in Abhängigkeit von der Kulturdauer *ab Aussaat ohne weiteren Medienwechsel* auf ihre Aktivität getestet.

IV.1.2.1 Abhängigkeit der Aktivität von GPT und GNT von der Kulturdauer

Um die Auswirkungen der Teilungsaktivität (und damit der Zelldichte bzw. der Zeitspanne seit dem letzten Medienwechsel) für die beiden GlcNAc-Transferasen zu untersuchen, wurde die primäre Fibroblastenkontrolle KO 741 bis zum Tag 9 nach Aussaat (Trypsinieren einer konfluenten Kultur, Teilung im Verhältnis 1:4.5) ohne Medienwechsel kultiviert. Nach 6 Tagen war bedingte Konfluenz, nach 9 Tagen vollständige Konfluenz mit etwas höherer Zelldichte erreicht. An Tagen 3, 6 und 9 war jeweils ein Aliquot geerntet und zum Enzymtest herangezogen worden. Dabei wurden je 145 μg Membranprotein mit 0.05 μCi radioaktivem UDP- ^{14}C GlcNAc umgesetzt. Für drei und 6 Tage Kultur wurde auf dieselbe KO 741-Charge wie unter IV.1.2.2 zurückgegriffen. Für Membranen zur Analyse der Aktivität nach 9 Tagen Kultur war eine unabhängige Charge KO 741-Zellen verwendet worden. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm in Abb. IV.1 zusammengefaßt. Bis zu 6 Tagen ändert sich wenig, dann allerdings findet ein Rückgang der Gesamt-GlcNAc-Lipidmenge auf 81 % bis zu Tag 9 statt, der seine Ursache augenscheinlich in einer Aktivitätsabnahme insbesondere von GPT (Alg7p_{hum}) hat: Der Anteil von DolPP-GlcNAc₂ steigt nicht nur relativ bezüglich der Gesamtmenge von 51 % bei 3 auf 70.5 % bei 9 Tagen, sondern auch absolut um 12 % an, während DolPP-GlcNAc₁ fällt, und zwar relativ auf die Gesamtmenge bezogen um 20 %, absolut sogar um über 50 %. Dies erscheint plausibel, da GPT als erste Transferase in der Kette derer, die den Aufbau der LLO-Kette bis DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ bestreiten, besonders stark reguliert sein könnte. In einem Review von Kukuruzinska *et al.* [74] wird die *ALG*-Genexpression in Hefe in Abhängigkeit vom Zellzyklus untersucht, andererseits aber auch die beachtlichen Auswirkungen einer reduzierten *ALG7*-Expression auf den Zellzyklus. Von den bisher untersuchten *ALG*-Genen scheint insbesondere *ALG7* eine große Bedeutung zuzufallen. Bereits 15 Minuten nach Glucose-Entzug sinkt der mRNA-Pegel auf 50 % des Ausgangswertes, die Zelle verläßt den Zellzyklus und tritt in die G0-Phase ein. Andererseits zeigen Kinetiken der Wachstumsinduktion zum Wiedereintritt in die Proliferationsphase bereits 3 Minuten nach Stimulation einen *ALG7*-Transkriptanstieg. Diese schnelle Induktion der Transkription von *ALG7* früh in der G1-Phase verhält sich damit ähnlich zum Histon *H2A*. Andererseits zeigt eine *alg7*-Mutante mit einer Deletion korrespondierend zum 3'-untranslatierten Bereich der mRNA und infolgedessen vierfach reduzierter GPT-Aktivität Unfähigkeit, nach Glucoseentzug in die G0-Phase einzutreten: Sie zeigt unverändert einen vielknospigen Phänotyp bei hoher Zelldichte. Weitere Auswirkungen auf den Zellzyklus sowie Defekte beim Austritt aus dem Zyklus in die Differenzierungsphase nach Stimulierung mit α -Faktor werden in dieser Veröffentlichung beschrieben.

Folglich kommt zumindest in Hefe der Zellzyklus-abhängigen Regulation von *ALG7* erhebliche Bedeutung zu. Dies könnte sehr wohl ähnlich auch bei höheren Eukaryonten der Fall sein und im in Abb. IV.1 beschriebenen Experiment zum Ausdruck kommen: Zwar wurde für die Zellkultur „DMEM High Glucose“ verwendet, nach 9 Tagen allerdings ist sicher mit Glucoseknappheit zu rechnen, und die gleichzeitig reduzierte Zellteilungsrate weist auf einen Eintritt in die G0-Phase hin. Verhielte sich die menschliche Zelle also ähnlich wie für *S. cerevisiae* beschrieben, wäre in der Tat zu erwarten, was zu beobachten ist: Ein Rückgang der GPT-Transferaseaktivität.

Nimmt man hier vereinfacht einen linearen Verlauf an (was dem ungünstigsten Fall entspricht), wären nach 7 Tagen noch immer 92 % Aktivität bezogen auf Gesamt zu erwarten, wobei etwa 62 % auf DolPP-GlcNAc₂ entfielen. Das schien in Anbetracht der dann wesentlich höheren Zelldichte vertretbar. Allerdings ist es äußerst wichtig für die experimentelle Vergleichbarkeit, jeweils nach

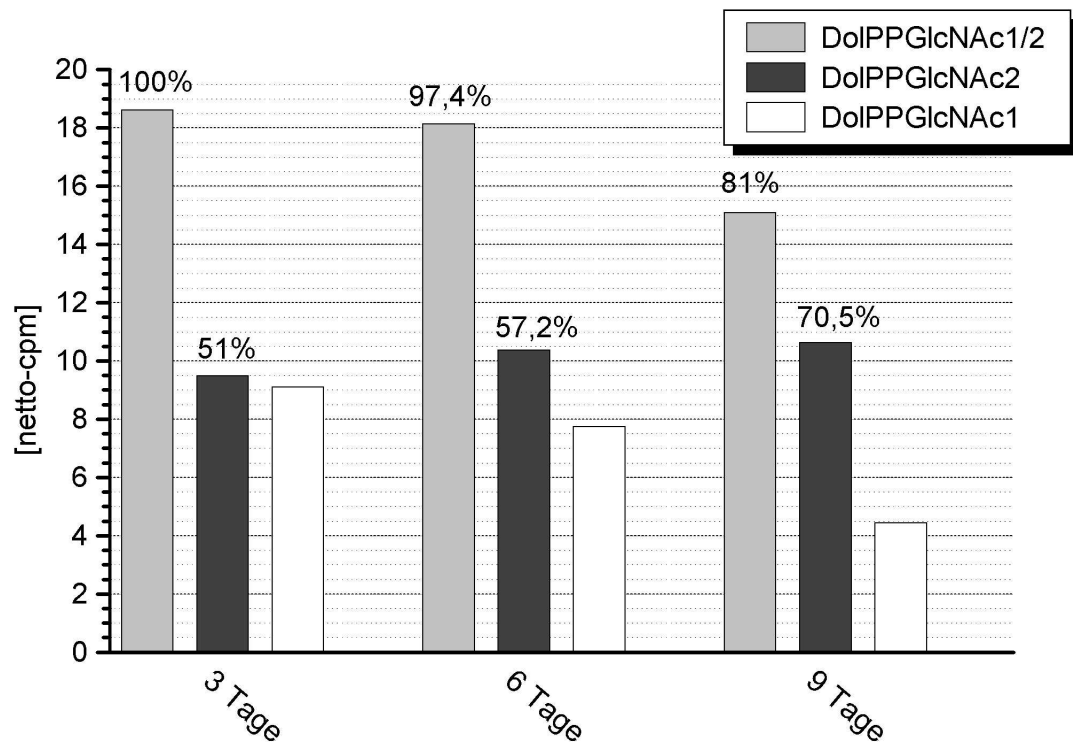


Abbildung IV.1: Aktivität von GPT und GNT in Fibroblastenmembranen in Abhängigkeit von der Kulturdauer bzw. des letzten Medienwechsels:

„DolPP-GlcNAc1/2“ spiegelt die Summe aus DolPP-GlcNAc₁ und DolPP-GlcNAc₂ wider, Prozentangaben beziehen sich auf den Wert bei 3 Tagen. Prozentangaben über der DolPP-GlcNAc₂-Säule beziehen sich auf dessen Anteil an der Summe aus DolPP-GlcNAc₁ und DolPP-GlcNAc₂.

Je Reaktion wurden 0.05 μCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc in Gegenwart von 17 mM MgCl₂ und etwa 25 % Glycerin mit 145 μg Membranprotein 15 Minuten bei 24°C inkubiert. Als Lipidakzeptor diente das endogene DolP der Membranen. Details zur Reaktion, der Aufarbeitung und Dünnschichtchromatographie finden sich unter A.2.11.2. Die Quantifizierung erfolgte über einen Dünnschichtscanner mit Proportionalzählrohr.

der gleichen Kultivierungsdauer bzw. Abstand vom letzten Medienwechsel zu ernten.

IV.1.2.2 Abhängigkeit der OST-Aktivität von der Kulturdauer

Die primäre Fibroblastenkontrolle KO 741 wurde bis zum Tag 10 nach Aussaat (Trypsinieren einer konfluenten Kultur, Teilung im Verhältnis 1:4.5) ohne Medienwechsel kultiviert. Nach 6 Tagen war bedingte Konfluenz, nach 10 Tagen vollständige Konfluenz mit etwas höherer Zelldichte erreicht. An Tagen 3, 6 und 10 war jeweils ein Aliquot geerntet und zum Enzymtest herangezogen worden. Im Folgenden sind die jeweiligen Aktivitäten tabellarisch protokolliert, wobei 100 % der Aktivität nach 3 Tagen Kultur entspricht (Tab. IV.1). Bei Annahme eines linearen Aktivitätsabfalls (ungünstigster Fall) wären nach 7 Tagen noch immer etwa 93 % der Aktivität vorhanden, und das bei guter Zelldichte.

Tabelle IV.1: OST-Aktivität von Fibroblastenmembranen in Abhängigkeit von der Kulturdauer bzw. des letzten Medienwechsels

Reaktion: 72 μg Membranprotein, 3000 cpm DolPP-[^{14}C]GlcNAc₂ und 1.5 mM Hexapeptid wurden jeweils 7.5 Minuten bei 24°C inkubiert. Für weitere Einzelheiten siehe A.2.10.2

Kulturdauer [Tage]	Glykopeptid [cpm]	Aktivität [%]
3	938	100
6	923	98.4
10	710	75.7

IV.1.2.3 Festlegung der methodischen Parameter für die Zellkultur

Aus den obigen Enzymtests war die Abhängigkeit vom Medienwechsel in Verbindung mit der Zelldichte bestimmt worden. Allerdings war nach 6 Tagen bei den meisten hier kultivierten primären Fibroblasten noch keine vollständige Konfluenz erreicht.

Untersuchungen zufolge, die O. Wiederer in seiner Doktorarbeit unternommen hatte [122], zeigen primäre Präadipozyten aus der Ratte 4 Tage nach der Aussaat bereits Konfluenz. Wird hier ein Medienwechsel vorgenommen, fällt der [^3H]-Thymidin Einbau bis zum 6. Tag kontinuierlich. Ein neuerlicher Medienwechsel am Tag 6 führt am Tag 7 zu einem erneuten Einbaumaximum von etwa 65 % des Wertes von Tag 4. bzw. 54 % von Tag 2 (hier noch keine Konfluenz). Das heißt, obwohl bereits am Tag 4 ein konfluenter Zellrasen vorhanden war, fanden nach dem Medienwechsel am Tag 6 erneute Teilungen statt, die Zellen rückten noch dichter aneinander. In einem analogen Experiment, beginnend mit Tag 11 und Medienwechsel (statt Tag 4) konnte ein Medienwechsel am Tag 13 keine Steigerung der niedrigen Basaleinbaurates von [^3H]-Thymidin am Tag 14 mehr auslösen. Die Zell-Zell-Kontakte waren nun so ausgeprägt, daß eine vollständige Proliferationshemmung die Folge war.

Analoge Beobachtungen konnten an den hier kultivierten Fibroblasten gemacht werden, allerdings zeitlich gedehnt. Meist war 7 Tage nach der Aussaat noch keine vollständige Konfluenz erreicht. Bei einem Medienwechsel am Tag 7 und Kultivierung bis Tag 14 war hier Konfluenz und eine etwas höhere Zelldichte zu beobachten. Eine weitere Woche Kultivierung nach Medienwechsel am Tag 14 führte zu noch höherer Zelldichte am Tag 21. Die Folgerung unter Einbeziehung der Ergebnisse von Wiederer war, daß die Teilungsrates in der zweiten Woche Kultur nach Medienwechsel am Tag 7 nicht wesentlich geringer sein sollte, als in der ersten Woche, sich die Zellen also im Zellzyklus und also auch in der Expression der getesteten Enzyme am Tag 14 nicht wesentlich vom Zustand am Tag 7 unterscheiden sollten. Infolgedessen war in der Regel folgender Rhythmus eingehalten worden: Aussaat am Tag 0, Medienwechsel am Tag 7, Ernte am Tag 14 (Abstand zum letzten Medienwechsel 7 Tage). Nur bei wesentlich schneller wachsenden Fibroblasten, wo bereits 7 Tage nach Aussaat Konfluenz erreicht war, fand die Ernte am Tag 7 statt, also ebenfalls 7 Tage Abstand zur Zuführung frischen Mediums. Auf diese Weise konnten gut reproduzierbare Ergebnisse in den Enzymtests erreicht werden. Weitere Einzelheiten zur Zellkultur sind unter A.1.3.1 beschrieben.

IV.2 Die Oligosaccharyltransferaseaktivität in Fibroblasten

Kinetik Um die Oligosaccharyltransferaseaktivität in Fibroblasten bezüglich eines CDG-Defekts einschätzen zu können, wurde zunächst eine Kinetik bis 40 Minuten durchgeführt. 3000 cpm des Minimalsubstrats für die OST, DolPP- ^{14}C GlcNAc₂, 3 mM Hexapeptid (YNLTSV) und 72 μg Membranprotein wurden bei 22.2°C die jeweils angegebene Zeit inkubiert. Wie aus Abb. IV.2 zu ersehen, sind zum Endpunkt der Kinetik (40 Minuten) knapp 60 % des Substrats verbraucht. Die von Anbeginn abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit dürfte daher nicht allein auf eine zeitabhängige Inaktivierung der OST, sondern auf die stetig sinkende Substratkonzentration zurückzuführen sein, die ohnehin sehr niedrig ist (etwa 0.23 μM). Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen schienen Testzeiten bis maximal 7.5 Minuten sinnvoll.

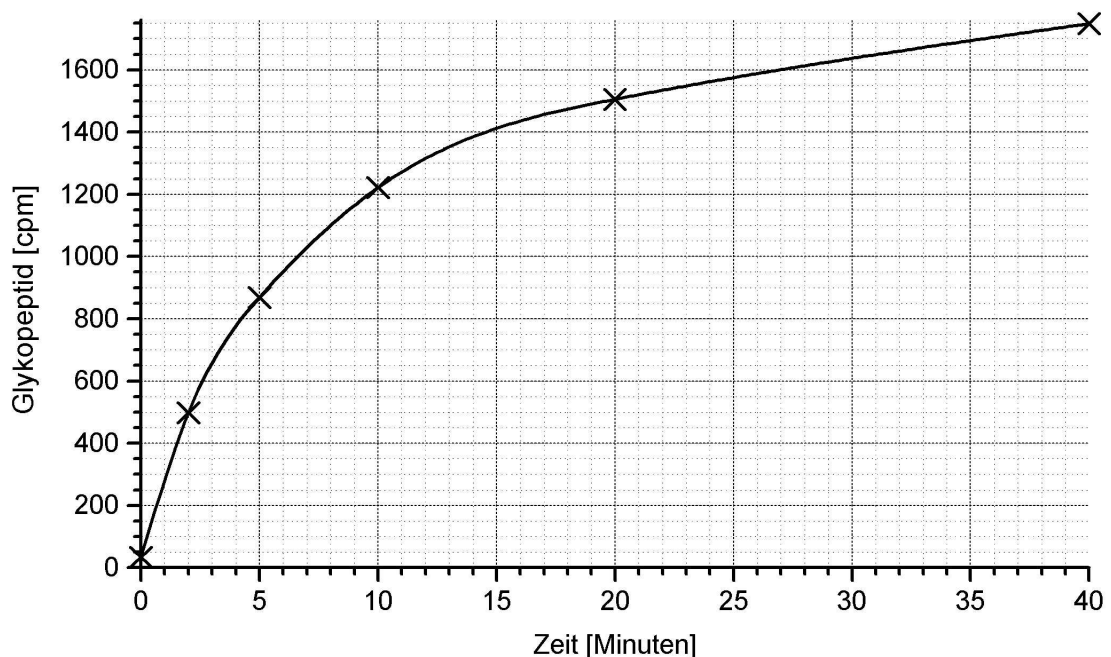


Abbildung IV.2: OST-Aktivität in Fibroblastenmembranen: Kinetik

3000 cpm DolPP- ^{14}C GlcNAc₂ (etwa 0.23 μM) wurden mit 3 mM Hexapeptid (YNLTSV) und 72 μg Membranprotein die jew. angegebene Dauer bei 22.2°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktionen, die Aufarbeitung sowie die Analyse über Szintillationszählung erfolgten wie unter A.2.10.2 beschrieben.

Bestimmung des apparenten K_M -Wertes für das Hexapeptidsubstrat Um die Abhängigkeit von der Peptidkonzentration einschätzen zu können, wurde bei einer DolPP- ^{14}C GlcNAc₂-Konzentration von etwa 0.38 μM (5000 cpm) die Peptidkonzentration variiert – angefangen bei 187.5 μM bis 4 mM – und in jeweils 3 Minuten dauernden Reaktionen (14.4 % des eingesetzten Substrats waren bei der höchsten Peptidkonzentration umgesetzt) über einen Lineweaver-Burk-Plot der apparente K_M für das Peptid-Akzeptorsubstrat bestimmt. Ausführliche „steady state“-kinetische Untersuchungen des Hefe-OST-Komplexes von Karaoglu *et al.* [52] legen zwar eine komplizierte allosterische Aktivierung des Komplexes durch das LLO-Substrat nahe (vgl. Einleitung), hinsichtlich des Peptid-Akzeptorsubstrats verhielten sich die Kinetiken aber konform mit einem „Random Sequential Bireactant“ System. Nach diesem Modell erfolgt also zunächst die Bindung eines LLO-Moleküles in einer regulativen Substratbindestelle. Dies beeinflusst dann

über (eine) Konformationsänderung(en) sowohl den K_M für das Peptid (kleiner für LLOGlc₃, größer für kurzkettigere LLOs – siehe dazu auch [108]) als auch – im Besonderen – den K_M für die Bindung eines zweiten LLOs in der katalytischen LLO-Bindetasche. Die Bindung des zweiten LLO-Moleküls als auch des Peptid-Akzeptormoleküls erfolgt aber wohl ungeordnet. Im Lineweaver-Burk Plot schnitten sich dabei die Geraden für verschiedene fixe Konzentrationen des LLO-Substrats bei $1/v = 0$, was für $\alpha = 1$ spricht, also gegen eine Änderung der Bindungseigenschaften für ein Substrat durch die vorherige Bindung des anderen. Unter der Prämisse, daß dies auch für das menschliche Enzym so ist, wäre für diesen Spezialfall ($\alpha = 1$) im Lineweaver-Burk Plot der Schnittpunkt der Gerade mit der X-Achse ($1/v = 0$) gleich $-1/K_M$ [106]. Der für das beschriebene Experiment erhaltene Plot ist in Abb. IV.3 zu sehen.

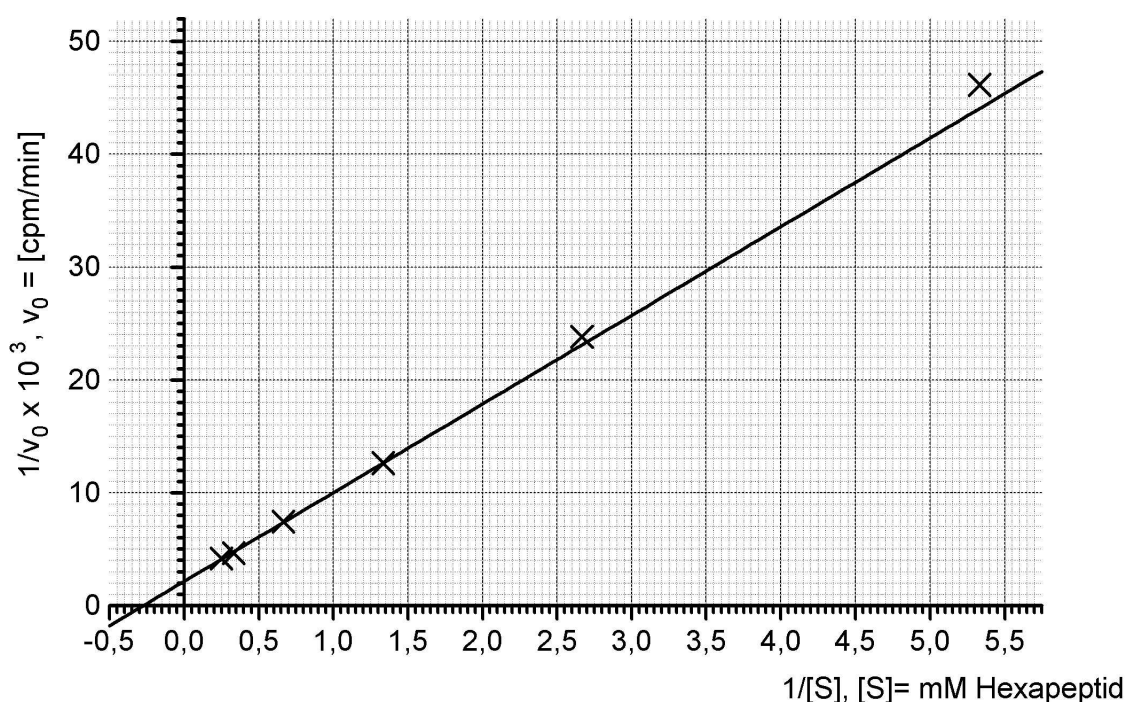


Abbildung IV.3: OST-Aktivität in Fibroblastenmembranen: Bestimmung des apparenten K_M -Wertes für das Hexapeptidsubstrat: $1/v_0$ gegen $1/[S]$ -Plot

5000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂ (etwa 0.38 μM) wurden mit Hexapeptidkonzentrationen (YNLTSV) von 187.5 μM bis 4 mM sowie 72 μg Membranprotein jeweils 3 Minuten bei 22.2°C inkubiert. Außerdem im Reaktionsansatz (unabhängig von der Peptidkonzentration): 8.8 % DMSO und 1.4 % Triton X-100. Das Abstoppen der Reaktionen, die Aufarbeitung sowie die Analyse über Szintillationszählung erfolgten wie unter A.2.10.2 beschrieben.

Der Schnittpunkt mit der X-Achse erfolgt bei -0.274 mM^{-1} , was einen apparenten K_M von 3.65 mM bedeuten würde. Dies ist ein vergleichsweise hoher Wert, der aber in einem weiteren Experiment dieser Art mit einer anderen Kontroll-Fibroblastenlinie bestätigt wurde (3.8 mM). Dies liegt einerseits sicherlich am LLO-Minimalsubstrat, das nachgewiesenerweise einen höheren K_M für das Peptid zur Folge hat als Vollängenssubstrat LLO(Glc)₃: 1.5-fach für DolPP-GlcNAc₂Man₉ [52] bzw. 12-fach für DolPP-GlcNAc₂ [108]. Andererseits könnte dies auch an der Enzympräparation liegen. Es handelt sich im Ansatz weder um einen solubilisierten Enzymextrakt, noch um ein detergensfreies System. So könnten Schwierigkeiten bezüglich der Verfügbarkeit des LLO-Substrats bzw. des Peptids für das Enzym einen höheren apparenten K_M bedingen. Beispielsweise hatte

DMSO, das im Reaktionsansatz aufgrund der unvollständigen Löslichkeit des Peptids in Wasser vorhanden ist (hier 8.8 %), im vergleichbaren Hefeansatz eine Umsatzsteigerung bis zu einer Konzentration von 19.8 % (im Reaktionsendvolumen!) zur Folge. Dies aber nur bei Einsatz von Membranen. Bei Einsatz von Solubilisat war je weniger DMSO, desto besser. Da DMSO als Carrier verschiedener Stoffe über Membranen fungiert, könnte dies die obige Theorie stützen.

Ziel war hier allerdings nicht die detaillierte Charakterisierung der menschlichen OST-Aktivität, sondern die Charakterisierung der Aktivität im vorliegenden *in vitro*-System zur Ausarbeitung geeigneter Patiententests, gegebenenfalls in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration, um auch „K_M-Mutanten“ im Test erfassen zu können.

Die apparente V_{max} bei der vorliegenden LLO-Konzentration, ermittelt über den Schnittpunkt mit der Y-Achse ($X = 0 \rightarrow Y = \frac{1}{V_{max}}(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]})$, mit $\alpha = 1$), beträgt 466.4 cpm/min, entsprechend etwa 1.77 pmol/min [106].

Variation der OST-Aktivität in Fibroblastenmembranen Um abschätzen zu können, wie groß die Variabilität der Oligosaccharyltransferase-Aktivität in unterschiedlichen Kontroll-Fibroblastenlinien ist, wurden drei Kontrollen parallel getestet und deren Mittelwert (KO Ø in Abb. IV.4) bestimmt. Demnach kommt es zu Abweichungen vom Mittelwert um bis zu 15 %. Die mit analysierten Patienten sind nicht in der OST, sondern in anderen Enzymen des Glykosylierungsweges defekt. Entsprechend weichen sie relativ wenig vom Mittel der Kontrollen ab (maximal 12 %).

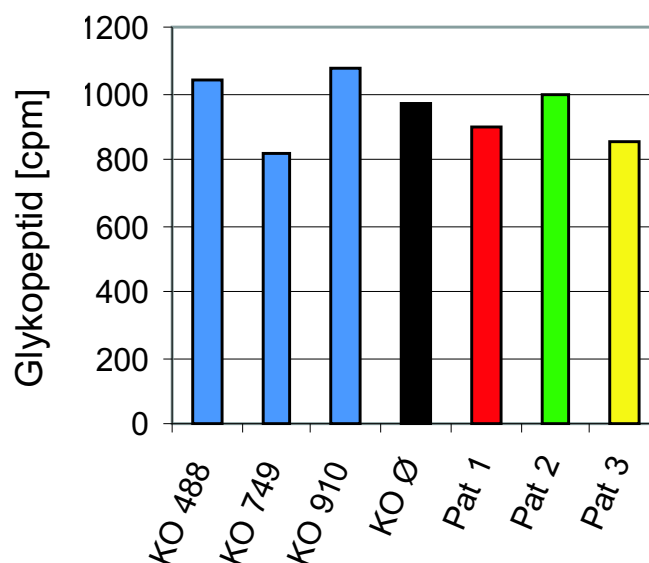


Abbildung IV.4: Variation der OST-Aktivität in Fibroblastenmembranen unterschiedlicher Kontrollen und Patienten mit Defekten anderswo im Glykosylierungspfad

3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂ und 3 mM Hexapeptid (YNLTSV) wurden mit 72 µg Membranprotein 7.5 min bei 24°C inkubiert, abgestoppt und über Szintillationszählung quantifiziert. Weitere experimentelle Details sind unter A.2.10.2 beschrieben.

Andererseits wurden in hier nicht dargestellten Experimenten fünf unterschiedliche Membraniso-

late einer Fibroblastenlinie analysiert, um experimentelle Schwankungen von der Zellkultur bis zur Reaktion zu erfassen. Hier waren die Differenzen untereinander mit 2-4 % sehr gering.

Aufgrund der relativ hohen Variabilität der OST-Aktivität zwischen unterschiedlichen Fibroblastenlinien ist es demnach wichtig, jeweils mehrere verschiedene Kontrollen neben den Patientenmembranen im Test zu haben. Die Abweichung vom Mittel der Kontrollen muß dann *deutlich* höher als 15 % sein, um auf einen OST-Defekt schließen zu können.

Dagegen ist die Reproduzierbarkeit des OST-Tests in Bezug auf eine diskrete Fibroblastenlinie sehr gut.

IV.3 Ein CDG-Fall mit mutiertem *RPN2*: Polymorphismus oder OST-Defekt im Patienten „DE“ ?

Ein CDG-Patient („DE“) war von Matthijs und Mitarbeitern aufgrund einer Mutation im *RPN2*-Gen (Ribophorin II) als potentieller OST-Defekt eingestuft worden. Rpn2p ist homolog zum essentiellen Hefe-*SWP1* und Bestandteil des OST-Komplexes aus Säugern. Den aktuellen Stand hinsichtlich der Säuger-OST gibt die Veröffentlichung von Nilsson *et al.* [90] wieder.

Zur Bestätigung und Erhärtung des genetischen Befundes wurden enzymatische Tests durchgeführt, deren negative Ergebnisse hinsichtlich der OST – positiv jedoch hinsichtlich zweier Enzyme des LLO-pathways – im Folgenden beschrieben werden. Als Proteinquelle wurden sowohl Lymphoblasten-Linien als auch Fibroblasten aus Kontrollen sowie Patienten selbst kultiviert (A.1.3.1, A.1.3.2).

IV.3.1 Untersuchungen zur Oligosaccharyltransferase-Aktivität mit kurzkettigen LLO-Intermediaten

Zunächst unternommene Untersuchungen der Enzymaktivität in Lymphoblastenmembranen unter Standard-Testbedingungen (DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂ und Hexapeptid YNLTSV) hatten keinen ersichtlichen OST-Defekt im Vergleich zu Kontrollen zu Tage fördern können. Die Frage war nun, ob nicht vielleicht das hier vorliegende Minimalsystem die Ursache sein könnte: Ein sehr kurzes Akzeptorpeptid sowie der kürzest mögliche LLO-Donor, der *in vitro* noch zum effektiven Transfer führt, *in vivo* aber nicht als Substrat fungiert, unter anderem vermutlich aus topologischen Gründen (cytoplasmatische Orientierung).

Dem ersten Gesichtspunkt wurde mit einem längeren, 14 Aminosäure-Peptid (GGHRRASVYNS-TSV) Rechnung getragen. Insbesondere wegen des hier vorliegenden Sequons NST, mit Serin an der X-Position und Threonin an dritter Stelle, weist dieses Peptid im Vergleich zum Standard-Hexapeptid einen etwa um die Hälfte reduzierten K_M -Wert auf. Entsprechend kamen im Standard-Assay nur 1.5 mM zum Einsatz (vgl. 3 mM mit YNLTSV).

Dem zweiten Gesichtspunkt wurde zunächst nur bedingt Rechnung getragen, indem DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁ als Substrat verwendet wurde. Dies ist ein geringfügig besserer Donor als DolPP-GlcNAc₂. Die Hoffnung war, mit der zusätzlichen Mannose eventuell weitere entscheidende Bindungsparameter des Enzyms hinsichtlich des LLO-Substrats erfassen zu können, ohne die experimentelle Basis des Tests ändern zu müssen (siehe unten).

Zwei derartige Experimente sind in Abb. IV.5 zusammengefaßt. Wie ersichtlich, war die OST-Aktivität in „*rpn2*“-Membranen nur unerheblich (17 %) niedriger als in den Kontrollen. „US“

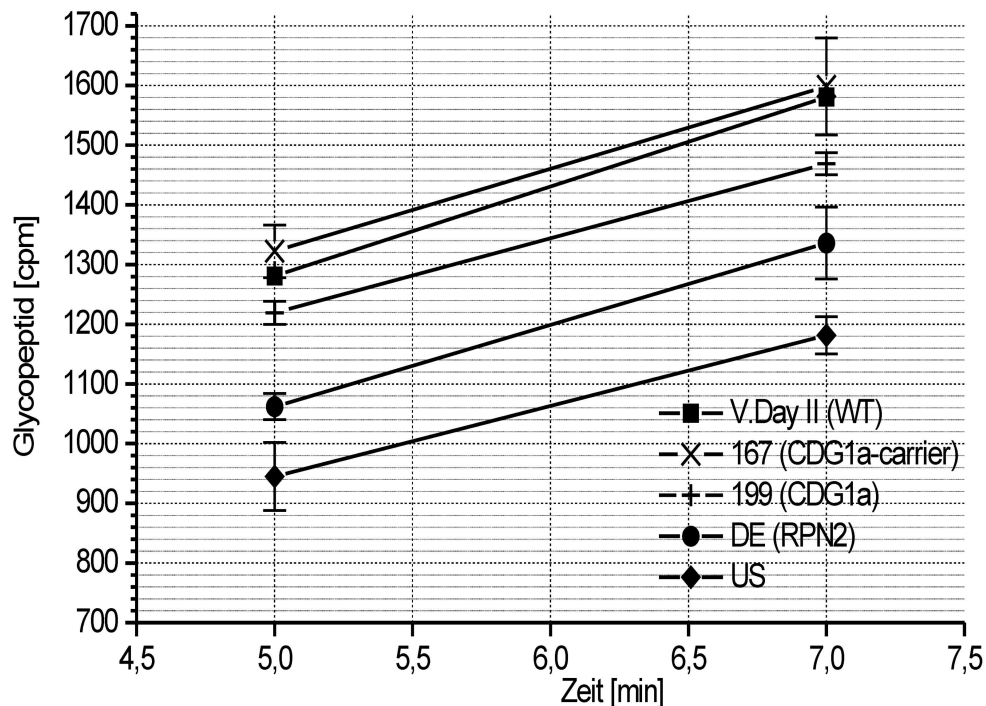


Abbildung IV.5: Oligosaccharyltransferasetest von präsumptiven *rpn2*-Fibroblasten und Kontrollen: DolPP-GlcNAc₂Man₁ und 14er Peptid, 5 und 7 Minuten

Folgende primäre Fibroblastenlinien wurden untersucht (für alle außer „V. Day II“ je zwei *unabhängige* Experimente, das heißt Membranen aus unterschiedlichen Zellernten, mit Angabe des Standardfehlers des Mittels (SEM) über Fehlerbalken):

1) Kontrollen: **V. Day II**, ohne Defekt; **167**, CDG1a-Carrier, ohne Phänotyp; **199**, CDG1a (Defekt in Phosphomannomutase) – Kontrolle in Hinsicht auf mögliche indirekte Auswirkungen anderer Glykosylierungsstörungen auf die OST-Aktivität;

2) Patienten: **DE**, präsumptiver *rpn2*-Defekt; **US**, Hinweise auf CDG-Typ I, später als Defekt in Alg7p_{hum} identifiziert [125];

Inkubationsbedingungen: Je 145 µg Membranprotein wurde mit 1.5 mM 14er Peptid und 3000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁ bei 25°C die jeweils angegebene Zeit umgesetzt, abgestoppt und aufgearbeitet wie unter A.2.10.2 beschrieben. Eine 0-Kontrolle für 6 Minuten wurde jeweils subtrahiert.

wies dabei sogar eine etwas niedrigere Aktivität auf. Der Glykosylierungsdefekt dieses Patienten wurde später auf das humane Alg7p (GPT) zurückgeführt [125].

Um diesen negativen Befund weiter abzusichern, wurde ein analoges Experiment durchgeführt, jedoch mit kürzeren Inkubationszeiten (3 und 5 min) und einer weiteren Kontrolle. Die Ergebnisse stimmen mit denjenigen aus Abb. IV.5 weitgehend überein (keine Abbildung).

Also sprechen all diese Daten gegen einen OST-Defekt in Patient „DE“. Allerdings wäre eine K_M-Mutation in Hinsicht auf das Peptid unter den bisherigen Testbedingungen unbemerkt geblieben. Um dies ausschließen zu können, waren zwei unterschiedliche Membranchargen aus genotypisch den Fibroblasten entsprechenden Lymphoblasten in zwei unabhängigen Experimenten bei niedriger Peptidkonzentration getestet worden (YNLTSV 0.75 mM, entsprechend etwa 1/5 K_M, vgl. IV.2). Das Donorsubstrat war hier DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂ (3000 cpm). Die Tests erfolgten jeweils mit 1 und 2 Minuten Inkubationszeit in der linearen Phase der Reaktion, so daß eine K_M-Mutation durch verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit in jedem Fall hätte auffallen sollen. In beiden Ex-

perimenten wies jedoch die präsumptive *rpn2*-Mutante „DE“ mittlere Transferaseaktivität auf, erscheint also völlig normal (keine Abbildung). Eine K_M -Mutation kann folglich für „DE“ sicher ausgeschlossen werden.

IV.3.2 Test mit Vollängen-LLO-Substrat und entsprechende Modifizierung der Aufarbeitungstechnik

Bevor nun endgültig ein OST-Defekt für die präsumptive *rpn2*-Mutante auszuschließen war, mußte noch ein Test mit Vollängen-LLO erfolgen – im Unterschied zur bisherigen Verwendung kurzketziger LLOs. Möglicherweise war ja im Patienten eine Domäne betroffen, die für die spezifische Bindung der endständigen Zuckerreste wesentlich war. So wird DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ wesentlich besser übertragen als kürzerkettige Intermediate [52].

Für dieses Experiment mußte jedoch von der etablierten Methodik abgerückt werden: Die experimentelle Schwierigkeit bei längerkettigen LLOs liegt in ihrer Amphiphilie und damit ihrer Anreicherung in der Interphase. Daher ist keine klare Trennung vom entstandenen Glykopeptid mehr möglich. Beim bisherigen Verfahren, einer Folchverteilung mit CHCl₃/CH₃OH/H₂O = 3:2:1, war eine klare Trennung von Produkt (Glykopeptid in der Oberphase) und Edukt (DolPP-GlcNAc₂ in der Unterphase) maximal bis DolPP-GlcNAc₂Man₁ möglich, wobei hier schon ein höherer Hintergrund in Kauf genommen werden mußte. Dieses Verfahren war also für das Vollängenoligosaccharidlipid nicht geeignet. Um DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ dennoch als Substrat verwenden zu können ohne den Weg einer aufwendigeren, mit Verlust verbundenen, chromatographischen Trennung gehen zu müssen, wurde ein neues Verfahren ausgearbeitet.

Mit der modifizierten Folch-Verteilung nach CHCl₃/CH₃OH/H₂O = 2:1:1 und der unter II.4.2.2 zur Aufreinigung von *in vitro* synthetisierten LLOs entwickelten synthetischen „upper phase“ für dieses System war, bei jeweils vorsichtigem Abnehmen der Oberphase und Zurücklassen einer großzügigen Interphase, ein nahezu verlustfreies „Auswaschen“ von Salzen oder Zuckernukleotiden möglich. Die LLO-Fraktion blieb in der Interphase konzentriert.

Hier bestand nun ein ähnliches Problem, nur daß die erwünschte Fraktion in der Oberphase zu suchen war. Infolgedessen wurde nach der originären Verteilung noch 3 mal mit UP 2:1:1 nachgewaschen und sämtliche abgenommene Oberphasefraktionen eines Ansatzes gepoolt, getrocknet und über Szintillationszählung die Radioaktivität ermittelt. In der 0-Kontrolle wurde kaum mehr gezählt als das, was an freier [³H]Mannose aus der metabolischen Markierung zur LLO-Gewinnung verschleppt worden war. Das Verfahren war also erfolgreich, eine chromatographische Trennung nicht notwendig.

In Abb. IV.6 ist nun das Experiment mit 4800 cpm DolPP-GlcNAc₂[³H]Man₉Glc₃ als Donorsubstrat und den üblichen 1.5 mM 14er-Peptid als Akzeptor zu sehen. Qualitativ entspricht das Ergebnis im Wesentlichen dem aus Abb. IV.5, wo DolPP-GlcNAc₂Man₁ als Donor fungierte. Dort war die Aktivität etwa 17 % niedriger als in der Kontrolle, hier sind es 10 bis 15 %, je nach betrachteter Kontrolle. Der Einsatz des Vollängen-Glykolipid-Donorsubstrats ändert also am Bild der bisherigen Ergebnisse nichts.

Zusammenfassend kann daher anhand aller unter IV.3.1 geschilderten Experimente mit großer Sicherheit ein Defekt in der Oligosaccharyltransferaseaktivität des Patienten „DE“ ausgeschlossen werden. Die Mutation im *RPN2*-Gen muß folglich ohne signifikante negative Folgen für die Enzymaktivität sein. Andererseits muß die Ursache des Krankheitsbildes (die Isoelektrische Fokussierung von Transferrin deutet auf CDG Typ I hin) dann mit großer Wahrscheinlichkeit in der frühen LLO-Synthese liegen.

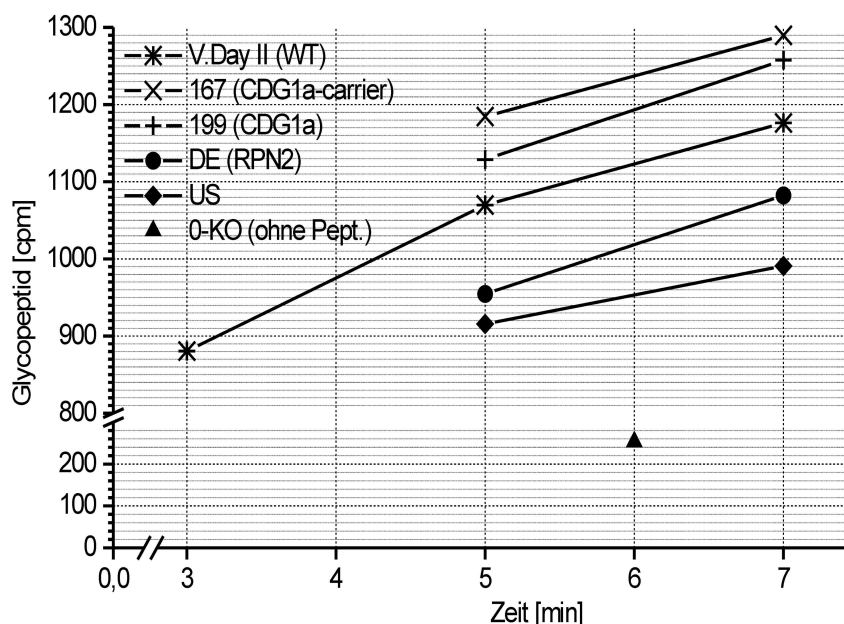


Abbildung IV.6: Oligosaccharyltransferasetest von präsumptiven *rpn2*-Fibroblasten und Kontrollen: LLO[³H]Man₉Glc₃ und 14er Peptid

Die getesteten Zellen sind unter Abb. IV.5 beschrieben, die Zellcharge und Membranpräparation ist identisch mit einem der beiden Experimente aus dieser Abbildung.

Inkubationsbedingungen: Je 145 µg Membranprotein wurde mit 1.5 mM 14er Peptid und 4800 cpm LLO[³H]Man₉Glc₃ bei 25°C die jeweils angegebene Zeit umgesetzt. Im Ansatz waren außerdem 1.3 mM 1-Deoxynojirimycin als Glucosidase-Inhibitor. Die Reaktionen wurden abgestoppt und aufgearbeitet wie unter A.2.10.2 für DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ beschrieben. Eine 0-Kontrolle (6 Minuten Inkubation ohne Peptid unter sonst gleichen Bedingungen) wurde jeweils subtrahiert.

IV.3.3 Analyse der LLO-Synthese des CDG-Patienten „DE“: Defekt in der DolP-Man-Synthase sowie der β1,4-Mannosyltransferase

IV.3.3.1 Patient „DE“ zeigt normale GPT-Aktivität sowie Stimulierbarkeit der GPT durch DolP-Man

Die sowohl durch Rückkoppelungsmechanismen als auch zellzyklusabhängig stark regulierte N-Acetylglucosaminyl-1-Phosphat-Transferase (GPT) ist das initiale Enzym der komplexen LLO-Synthesekette und damit wohl entscheidend für die Aufrechterhaltung der Homöostase bezüglich LLO-Verbrauch und Neusynthese (vgl. III.1 und Unterkapitel sowie IV.1.2.1). Ungenügende Neusynthese von LLOs würde Substratmangel für die Oligosaccharyltransferase bedeuten und Kettenausfall bei normalerweise glykosylierten Sequenzen nach sich ziehen – ein biochemischer Phänotyp wie er auch bei direktem Defekt in der OST denkbar wäre. Daher schien ein Test dieses Enzyms zunächst vordringlich, auch hinsichtlich der Stimulierbarkeit durch DolP-Man (vgl. III.1.3).

Membranen aus Kontrollfibroblasten (167) sowie aus Fibroblasten des Patienten „DE“ wurden solubilisiert und auf GPT-Aktivität getestet. Darüber hinaus war die Stimulierbarkeit durch exogen zugegebenes DolP-Man Gegenstand der Untersuchung.

Wie Abb. IV.7 zeigt, ist die GPT-Grundaktivität (ohne DolP-Man-Stimulierung) nur etwa 18 % geringer als in der Kontrolle, was als nicht signifikant betrachtet werden darf.

Auch die Aktivierung durch DolP-Man ist nicht wesentlich reduziert: Absolut wurden knapp 86 %

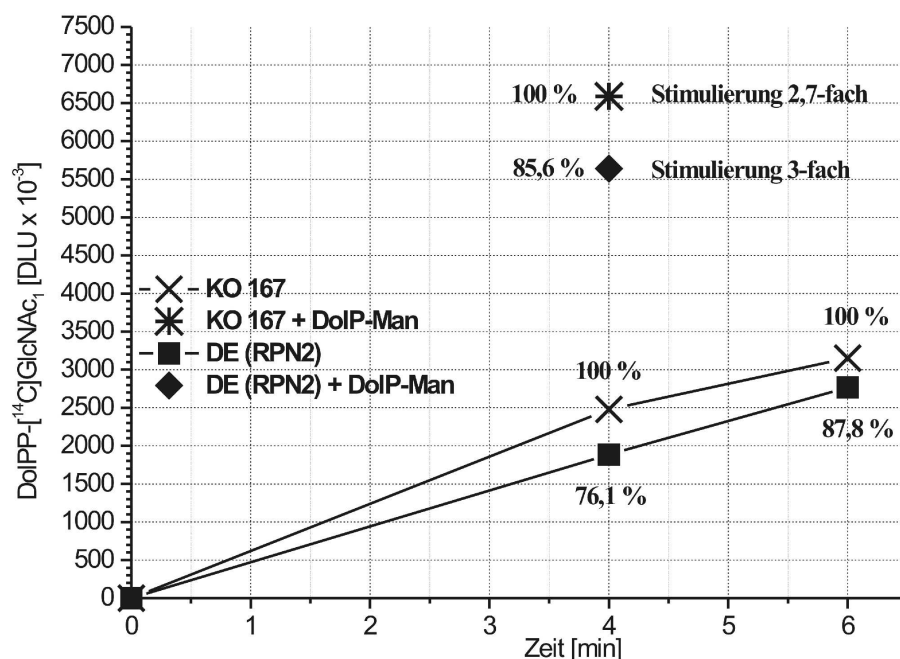


Abbildung IV.7: Patient „DE“ (vermeintlich *rpn2*): GPT-Aktivitätstest sowie Test auf Stimulierbarkeit mit DolP-Man im Vergleich zur Kontrolle 167

Reaktion, Inkubation und Dünnschichtchromatographie erfolgten wie unter A.2.11.4 beschrieben. Die DolP-Man-Konzentration zur Stimulierung der GPT betrug 0.5 μ M. **Quantifizierung** über Phosphorimaging-System und Optiquant.

der Kontrollaktivität erreicht, relativ war die Stimulierung (3-fach) sogar noch etwas ausgeprägter als bei der Kontrolle (2.7-fach).

Die gegenüber der Kontrolle leicht verminderte Aktivität kann auf Sekundäreffekte eines pathogenen Glykosylierungsdefekts zurückzuführen sein und liegt überdies nicht wesentlich über der normalen Schwankungsbreite. Ein Defekt in der GPT-Aktivität ist daher mit großer Sicherheit auszuschließen.

IV.3.3.2 Patient „DE“ weist normale GNT-Transferaseaktivität auf

Die in der LLO-Synthese auf GPT folgende GlcNAc-Transferase (GNT), deren Gen bislang noch unentdeckt blieb, war der nächste mögliche Defekt-Kandidat. Das Experiment zur Aktivitätsbestimmung wurde wie unter A.2.11.5 beschrieben durchgeführt, allerdings mit nur 19 μ l DolPP- ^{14}C GlcNAc₁-Prämix, entsprechend 8140 cpm oder $9598,8 \times 10^3$ DLU.

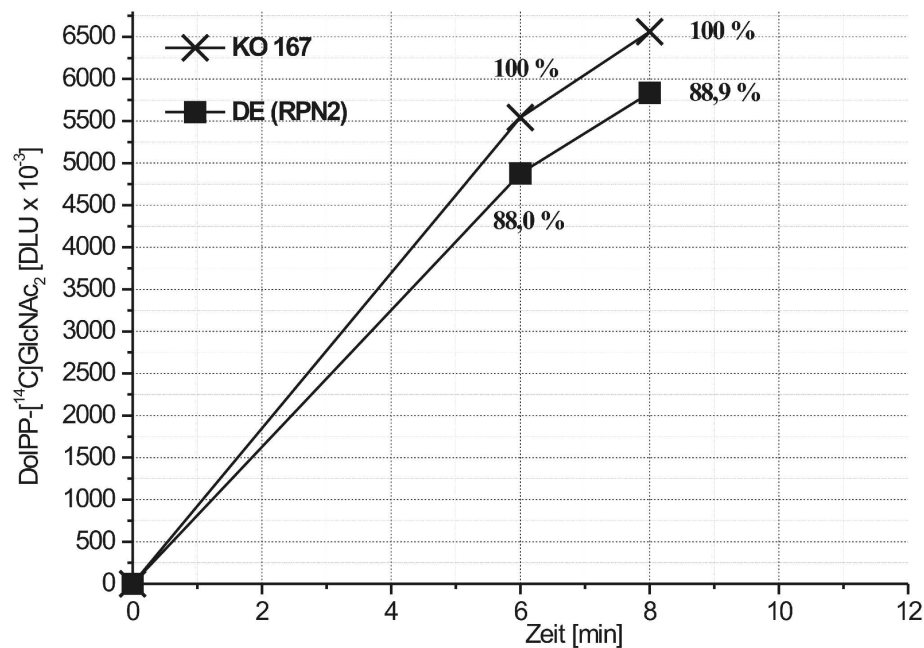


Abbildung IV.8: Patient „DE“ (vermeintlich *rpn2*): GNT-Aktivitätstest im Vergleich zur Kontrolle 167

Reaktion, Inkubation und Dünnschichtchromatographie erfolgten wie unter A.2.11.5 beschrieben, allerdings kamen nur 8140 cpm DolPP- ^{14}C GlcNAc₁ zum Einsatz. **Quantifizierung** über Phosphorimaging-System und Optiquant. Die eingesetzte Netto-Eduktmenge an Glykolipid entspricht $9598,8 \times 10^3$ DLU.

Wie sich aus Abb. IV.8 ergibt, zeigt Patient „DE“ verglichen mit Kontrolle 167 allenfalls eine marginale Reduktion in der GNT-Aktivität von 11 - 12 %. Auch dies kann nicht als spezifischer Defekt im untersuchten Enzym angesehen werden, spiegelt vielmehr die natürliche Schwankungsbreite wider.

IV.3.3.3 Patient „DE“ weist deutlich reduzierte DolP-Man-Synthaseaktivität auf

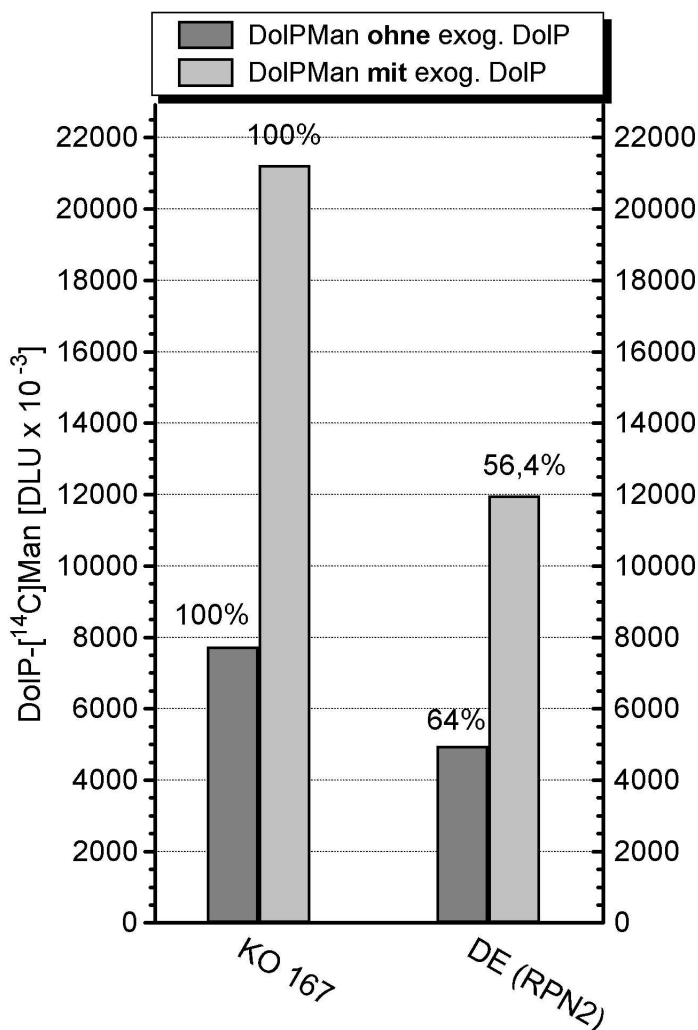


Abbildung IV.9: Patient „DE“ (vermeintlich *rpn2*): DolP-Man-Synthaseaktivitätstest im Vergleich zur Kontrolle 167 mit und ohne exogenem DolP

Reaktion, Inkubation und Aufarbeitung erfolgten wie unter A.2.11.6 beschrieben. Dabei wurden für den Test *ohne* exogenem DolP 160 µg, für den Test mit exogenem DolP nur 82 µg Membranprotein eingesetzt. Die DolP-Konzentration (exogen) betrug 0.06 µg/µl. Die Analyse erfolgte über Dünnschichtchromatographie (C/M/H = 65:25:4, DolP-Man als einziges Produkt), die Quantifizierung über das Packard Phosphorimaging-System und Optiquant.

Nachdem sich die Aktivität der beiden ersten Glykosyltransferasen als normal erwiesen hatte, wurde als Nächstes die DolP-Man Synthase getestet. Um gleichzeitig den endogenen DolP-Spiegel auf Normalität zu überprüfen, wurde die DolP-Man-Synthasereaktion einmal ohne Zugabe von exogenem DolP und einmal unter Zugabe von DolP durchgeführt. Sollte eine Defizienz in DolP zu einer verringerten Synthaseaktivität führen, wäre bei Zugabe von exogenem DolP in sättigender Konzentration (0.06 µg/µl) normale Aktivität zu erwarten. Reduzierte Aktivität in beiden Fällen spricht für einen Defekt in der DolP-Man-Synthase. Wie Abb. IV.9 zeigt, trifft letzteres zu: Bei Zugabe von exogenem DolP verstärkt sich gar der gegenüber der Kontrolle reduzierte Umsatz etwas (von -36 % auf -43.6 %). Die also sowohl bei endogenem als auch bei Zugabe von exogenem DolP gegenüber der Kontrolle signifikant reduzierte DolP-Man Synthaseaktivität im Patienten „DE“ muß damit auf einen Defekt in der DolP-Man Synthase selbst zurückgeführt werden. Der DolP-Pool in der ER-Membran des Patienten ist aller Wahrscheinlichkeit nach normal.

IV.3.3.4 Die Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ ist im Patienten „DE“ deutlich reduziert

In den Fibroblasten des Patienten „DE“ war eine verglichen mit der Kontrolle schwache Aktivität der DolP-Man Synthase gefunden worden, gleichwohl schien es fraglich, ob dies allein das schwe-

re Krankheitsbild erklären könnte. Deshalb wurden nun auch die Mannosyltransferase-Reaktionen, die DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ verlängern, einbezogen. Dabei wurden 2 Inkubationszeiten, nämlich 5 und 10 Minuten gewählt. Die Methodik folgt dem unter A.2.11.7 angegebenen Protokoll. Abb. IV.10 zeigt die entsprechenden HPLC-Profile der Kontrolle 167 (A und

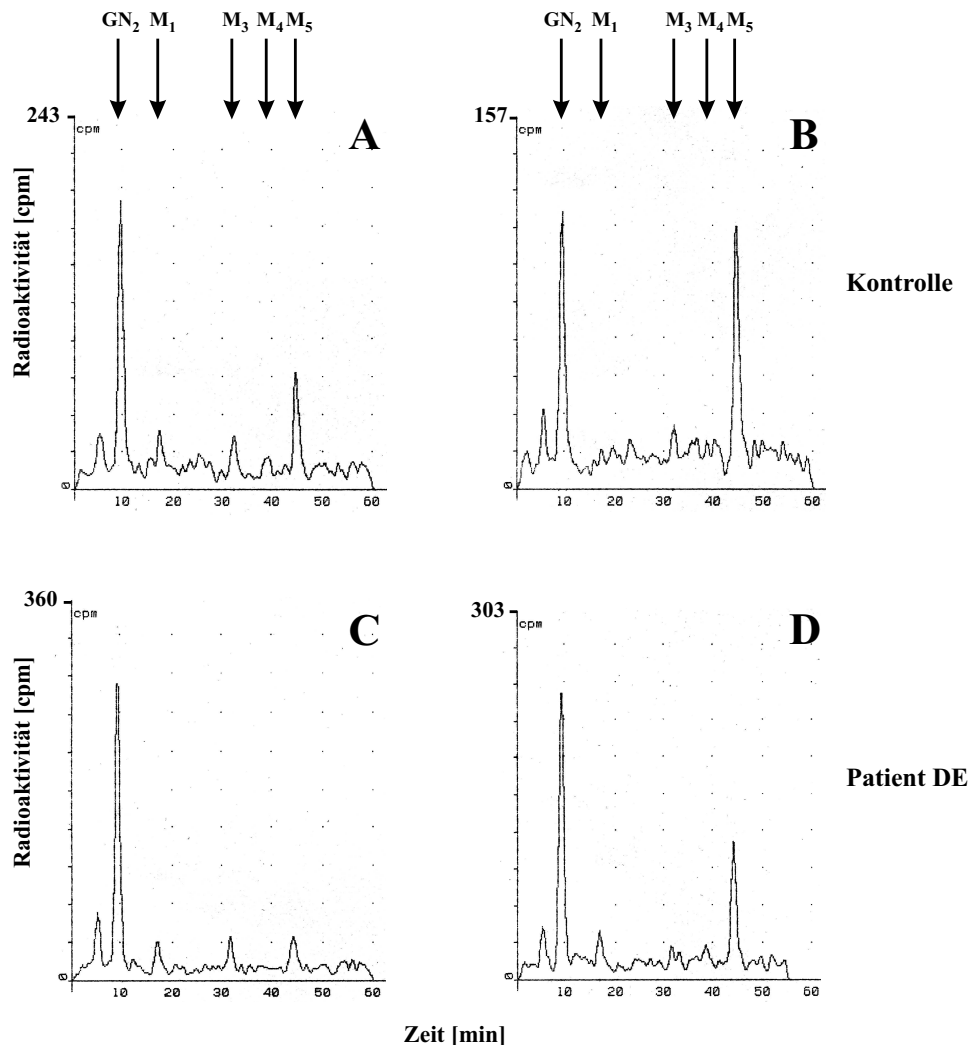


Abbildung IV.10: Patient „DE“ (vermeintlich *rpn2*): Mannosyltransferasetest aller 5 cytosolisch aktiven Transferasen im Vergleich zur Kontrolle 167

Profile A und B bzw. C und D entsprechen der 5 und 10 Minuten-Reaktion von Kontrolle 167 bzw. Patient. GN₂ = DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂, das LLO-Substrat, von dem 3000 cpm eingesetzt wurden. M₁ bis M₅ bedeuten die Verlängerung des Substrats um die entsprechende Anzahl von Mannosen mit kaltem GDP-Man als Donorsubstrat (1 mM). Inkubation und HPLC-Analyse erfolgten wie unter A.2.11.7 beschrieben.

B) sowie des Patienten (C und D) für jeweils 5 bzw. 10 Minuten respektive. Es zeigt sich eine deutlich verlangsamte Bildung von DolPP-GlcNAc₂Man₅ im Patienten, so daß hier nach 10 Minuten Reaktion 40 % weniger DolPP-GlcNAc₂ zu DolPP-GlcNAc₂Man₅ umgesetzt sind als in der Kontrolle. Da keinerlei Intermediatakkumulation erfolgt, scheint ein Defekt bereits in der ersten (β1,4-)Mannosyltransferase wahrscheinlich.

IV.3.3.5 Im Patienten „DE“ sind die Aktivitäten der α -Mannosyltransferasen von DolPP-GlcNAc₂Man₁₋₅ normal, der Defekt liegt in der β 1,4-Mannosyltransferase

Um dem Verdacht eines Defekts in der β 1,4-Mannosyltransferase, welche die erste Mannose auf DolPP-GlcNAc₂ überträgt, nachzugehen, wurde das obige Experiment **unter Verwendung desselben Solubilisats** wiederholt, mit dem einzigen Unterschied, daß DolPP-GlcNAc₂Man₁ anstelle von DolPP-GlcNAc₂ als Akzeptorsubstrat angeboten wurde. Die Inkubation erfolgte in der Kontrolle über 2, im Patienten über 2 und 4 Minuten. Aus dem Vergleich der 2 Minuten-Werte von Kontrolle und Patient „DE“ in Abb. IV.11 ist klar ersichtlich, daß die Aktivitäten der getesteten α -Mannosyltransferasen im Patienten nicht geringer sind als in der Kontrolle. Dabei ist das Profil aus der 4 Minuten-Reaktion des Patienten praktisch gleich dem der Kontrolle aus Abb. III.11.

Die Reaktionen von DolPP-GlcNAc₂Man₁ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅ sind im Patienten also *nicht* beeinträchtigt – im Gegensatz zur Reaktionsfolge DolPP-GlcNAc₂ bis DolPP-GlcNAc₂Man₅, die signifikant reduziert war (vgl. Abb. IV.10). Der Defekt muß also in der Tat in der β 1,4-Mannosyltransferase, codiert von *ALG1*, liegen.

Dabei bestätigt die hohe Übereinstimmung zwischen dem hier gezeigten Experiment und dem aus Abb. III.11 bezüglich der Reaktionen aufwärts von DolPP-GlcNAc₂Man₁ die hohe experimentelle Standardisierung von der Zellkultur bis zur HPLC-Analyse und unterstreicht damit die Signifikanz der unter IV.3.3.4 gefundenen Reduktion in der Aktivität der β 1,4-Mannosyltransferase.

IV.3.4 CDG-Patient „DE“: Diskussion des biochemischen Phänotyps

Die oben geschilderten Experimente zeigen, daß Patient „DE“ weder reduzierte OST-Aktivität zeigt, noch in der GlcNAcP-Transferase (GPT), der GlcNAc-Transferase (GNT) oder den cytosolisch orientierten α -Mannosyltransferasen signifikant erniedrigte Aktivität aufweist. Signifikant reduziert in ihrer Aktivität sind hingegen sowohl die DolP-Man-Synthase als auch die erste Mannosyltransferase mit β 1,4-Transferaseaktivität. Zwar ist in beiden Fällen noch eine relativ hohe Restaktivität vorhanden. Beide Defekte im Zusammenspiel könnten jedoch gravierendere Konsequenzen haben:

Ein kleinerer DolP-Man Pool in der ER-Membran ist möglicherweise zu gering, um die für eine ausreichende LLO-Syntheseinitiation nötige Stimulierung der ersten GlcNAc-Transferase (GPT) zu gewährleisten (vgl. III.1.3). In der Folge entstünde auch weniger DolPP-GlcNAc₂, das Substrat der ohnehin schon mit mangelhafter Aktivität agierenden β 1,4-Mannosyltransferase (*Alg1p_{hum}*). So käme es zu einer stark erniedrigten DolPP-GlcNAc₂Man₁-Bildung und damit schließlich zu deutlich weniger DolPP-GlcNAc₂Man₅ als im Wildtyp.

Aufgrund dieser gravierenden Mengenreduktion wäre der Umfang von DolP-Man im ER – obgleich viel kleiner als in der Kontrolle – doch ausreichend für die vollständige Verlängerung bis DolPP-GlcNAc₂Man₉ und in der Folge DolPP-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Der OST stünde zwar Vollängensubstrat zur Verfügung, allerdings in unzureichendem Umfang. Nicht alle N-X-S/T-Sequons könnten bedient werden. Falls Glykosylierung stattfände, würde jedoch das Vollängen-Oligosaccharid übertragen. Ein biochemisches Bild, das nicht von dem eines OST-Defekts zu unterscheiden wäre. Träfe die hier beschriebene Theorie der Rückkopplung über DolP-Man auf die LLO-Syntheseinitiation (über GPT) *nicht* zu, sollte dies im Oligosaccharidmuster des CHCl₃/CH₃OH/H₂O LLO-Extrakts zutage treten: Unzureichende DolP-Man Mengen würde dann die Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂Man₅ luminal limitieren. Es käme wahrscheinlich zur Bildung von DolPP-GlcNAc₂Man₅₋₈Glc₃ [10, 71, 118] neben dem Vollängen-LLO, das entsprechend reduziert vorläge (vgl. Einleitung). Da die OST präferentiell Vollängen-LLO überträgt [52, 108],

würde dies das Bild noch verstärken.

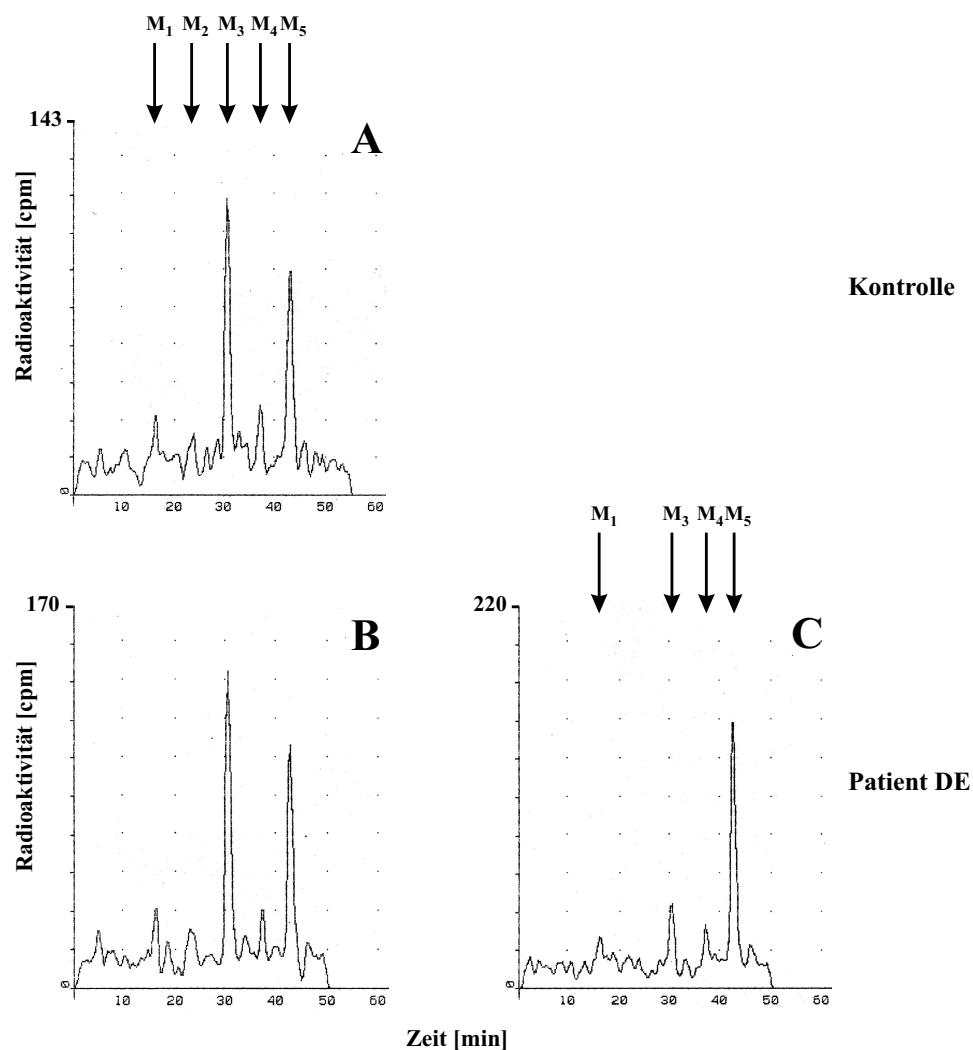


Abbildung IV.11: Patient „DE“ (vermeintlich *rpn2*): Aktivitätstest aller 4 cytosolisch aktiven α -Mannosyltransferasen im Vergleich zur Kontrolle 167

Profile A und B entsprechen den 2 Minuten-Reaktionen von Kontrolle 167 bzw. Patient, Profil C der 4 Minuten-Reaktion des Patienten. M₁ = DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₂Man₁, das LLO-Substrat, von dem 3000 cpm eingesetzt wurden. M₂ bis M₅ bedeuten die Verlängerung des Substrats um die entsprechende Anzahl von Mannosen mit kaltem GDP-Man als Donorsubstrat (1 mM). Inkubation und HPLC-Analyse erfolgten wie unter A.2.11.7 beschrieben.

Träfe die Theorie dagegen zu, würde sich das Oligosaccharidmuster des Patienten *qualitativ* nicht von Kontrollzellen unterscheiden: Wegen der reduzierten Initiation der LLO-Synthese aufgrund mangelhafter DolP-Man Stimulierung von GPT und einer noch weiter verringerten Bildungsrate von DolPP-GlcNAc₂Man₁ durch den Defekt in der β 1,4-Mannosyltransferase würde wesentlich weniger DolPP-GlcNAc₂Man₅ gebildet als in Kontrollzellen – für dessen luminale Verlängerung auch die reduzierte DolP-Man Menge ausreichen sollte. Nach diesem Modell würde sich nur die Quantität des Oligosaccharidmusters des LLO-Extrakts ändern, nicht die Qualität. Und zumindest qualitativ scheint es hier keine Auffälligkeiten zu geben (einer Mitteilung von Matthijs zufolge).

Höchstwahrscheinlich ist also jeder Defekt an sich im hier beobachteten Ausmaß ohne pathologischen Effekt für den Träger, und erst das Zusammentreffen beider im gleichen Individuum führt zur Erkrankung. Bislang jedoch steht für beide hier beobachteten enzymatischen Defekte die genetische Analyse aus.

Der zu Anfang aufgrund einer Mutation in *RPN2* vermutete OST-Defekt konnte jedenfalls mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

Die Protein-N-Glykosylierung ist, zumindest hinsichtlich der im ER-lokalisierten Prozesse, vom niederen Eukaryonten bis hin zum Menschen hoch konserviert – in Übereinstimmung mit der in den letzten Jahren erkannten hohen funktionellen Bedeutung dieser Modifikation. Insbesondere für die frühe Entwicklung vielzelliger Organismen, wo unter anderem das Schließen und Lösen von Zell-Zell-Kontakten eminent wichtig ist, spielen Glykoproteine eine herausragende Rolle. Dies spiegelt sich auch in einer wachsenden Zahl von Fällen des Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)-Syndroms wider, das in der frühkindlichen Entwicklung besonders schwer ausfällt und sich in späteren Jahren – soweit diese erreicht werden – oftmals mildert.

Das Schlüsselenzym im Glykosylierungsprozeß stellt die Oligosaccharyltransferase (OST) dar. Der aus acht Untereinheiten bestehende heterooligomere Enzymkomplex übt, eingebettet in die ER-Membran, seine Aktivität luminal in enger Assoziation mit dem Translokon aus, indem er kotranslational das über eine Pyrophosphatbindung am Lipidanker Dolichol fixierte GlcNAc₂-Man₉Glc₃ auf den Amidstickstoff des Asn-Restes in Sequons der Folge Asn-Xaa-Ser/Thr der naszierenden Polypeptidkette überträgt.

Nicht weniger wichtig allerdings ist die Voraussetzung für diesen Prozeß, die hochgeordnet ablaufende Synthese des dolicholgebundenen Oligosaccharidrestes. Um diese Vorgänge zu entschlüsseln, erwies und erweist sich *S. cerevisiae* mit all den inzwischen charakterisierten *alg*-Mutanten (asparagine linked glycosylation) als Modellorganismus von großem Wert.

Beide Aspekte des Glykosylierungsprozesses, der Oligosaccharyltransfer durch die OST selbst wie auch die vorgeschaltete Synthese des lipidgebundenen Oligosaccharids (LLO) auch und vor allem im Hinblick auf die Charakterisierung von Erkrankungen des CDG-Typs I, waren Gegenstand der in der Arbeit durchgeführten, in erster Linie biochemisch orientierten, Untersuchungen.

Arbeiten mit *S. cerevisiae* als Modellorganismus

Zwei distinkte OST-Komplexe: OST3-Komplex und OST6-Komplex

Mit relativ großer Sicherheit sind inzwischen alle Untereinheiten der Hefe-OST bekannt [67]. Die Frage nach deren Funktion ist aber, vielleicht mit Ausnahme von Stt3p [90, 121], noch unbeantwortet. Im besonderen Interesse dieser Arbeit stand aufgrund der Untersuchungen von R. Knauer [65,66] die Beziehung der nichtessentiellen, homologen und vor allem strukturell sehr ähnlichen Untereinheiten Ost3p und Ost6p zueinander bzw. deren Bedeutung für den Komplex.

Durch die Kombination von Wachstumstests (I.1.1), SDS-PAGE/Western-Analyse hinsichtlich Ost3p und Ost6p (I.1.2.1) sowie der Interpretation noch unveröffentlichter „Blue native PAGE“-Daten von R. Knauer zum Gesamtkomplex (I.1.2.2) konnten folgende Schlußfolgerungen gezogen werden (vergleiche vor allem I.1.2.2):

Insbesondere aus der Analyse der „Blue native-PAGE western blots“ geht klar hervor, daß es *zwei distinkte* OST-Komplexe gibt, übereinstimmend in den sieben Untereinheiten Ost1p, Ost2p, Ost4p, Ost5p, Stt3p, Swp1p, Wbp1p und charakterisiert durch eine der beiden homologen Untereinheiten Ost3p und Ost6p – im Folgenden als *OST3-Komplex* und *OST6-Komplex* bezeichnet. Sowohl die SDS-PAGE Untersuchungen als auch die „Blue native PAGE“-Daten sprechen für die quantitative Dominanz des Ost3-Komplexes, der Ost6-Komplex liegt im Unterschuß vor.

Die strukturell sehr ähnlichen Untereinheiten Ost3p und Ost6p können sich gegenseitig aus dem Komplex verdrängen bzw. ersetzen. Dies konnte bei Überexpression jeweils einer der beiden Untereinheiten aus den SDS-PAGE/Western-Analysen abgeleitet werden. Danach scheint Ost3p mit höherer Affinität an den Komplex zu binden als Ost6p, da es dieses bei Überexpression in weitaus größerem Maße (bis auf 20 %) verdrängt als umgekehrt überexprimiertes Ost6p Ost3p verdrängen konnte (60 % Ost3p, vgl. Tab. I.1). Auch aus den „Blue native PAGE“-Daten läßt sich eine Verdrängung von Ost6p aus dem Komplex durch überexprimiertes Ost3p folgern.

Damit übereinstimmend konnte aus beiden Untersuchungen abgeleitet werden, daß Ost3p oder Ost6p, überexprimiert in der Doppeldisruptante, auch an die Komplexe, welche sonst von der komplementären Untereinheit besetzt sind, binden können. Dadurch entsteht eine homogene Komplexpopulation mit ausschließlich Ost3p oder ausschließlich Ost6p, die das Molekulargewicht des nativen Komplexes zeigt.

Weiter weist Ost3p gemäß den SDS-PAGE/Western-Analysen im freien, nicht komplexgebundenen Zustand eine ausgeprägte Stabilität auf, wogegen Ost6p nur komplexgebunden stabil ist.

Was die Funktionalität dieser beiden distinkten Komplexe angeht, wurde aus den Wachstumstests eine besondere Bedeutung des OST6-Komplexes für die Zellwandintegrität unter Stressbedingungen offenbar, die in $\Delta ost3 \Delta ost6$ auch durch Überexpression von Ost3p in keiner Weise ersetzt werden konnte (vgl. Abb. I.1). Doch fand eine auf der Koffein-Sensitivität von $\Delta ost6$ beruhende Hypothese, der OST6-Komplex könnte bei stark O-glykosylierten Rezeptorproteinen des „cell wall integrity-pathways“ für deren – soweit vorhanden – ebenso essentielle *N*-glykosidische Modifizierung (für Mid2p) speziell verantwortlich sein, experimentell keine Bestätigung. Die molekularen Mechanismen, die in der besonderen Bedeutung des OST6-Komplexes für *S. cerevisiae* hinsichtlich Zellwandstress münden, bleiben daher unverstanden.

Für weitergehende Untersuchungen am OST-Komplex aus Hefe gelang die Entwicklung eines neuen Solubilisierungsverfahrens unter Anwendung einer hohen NaCl-Konzentration (1,2 M, vgl. I.2). Hohe Aktivität und vor allem eine ausgesprochene Stabilität (78 % Restaktivität nach 72 Stunden bei 4°C, siehe Abb. I.7) zeichnen dieses Solubilisat aus.

***In vitro*-Synthese kurzkettiger DolPP-Oligosaccharid (LLO)-Substrate in Enzymsolubilisaten aus Hefemembranen**

Zur enzymatischen Charakterisierung humaner Glykosylierungsdefekte in der frühen LLO-Synthese bedurfte es entsprechender kurzkettiger Akzeptorsubstrate. Um diese in ausreichender Menge und Reinheit gewinnen zu können, wurden die folgenden Syntheseverfahren erarbeitet:

Bisher existierte kein Verfahren, die labile GPT-Aktivität (Alg7p, GlcNAc-Phosphat-Transferase) ohne gleichzeitige Anwesenheit einer hohen Aktivität des folgenden Enzyms, der GlcNAc-Transferase (GNT), zu solubilisieren – eine Voraussetzung zur Gewinnung von DolPP-GlcNAc₁ in ausreichender Menge und Reinheit. Hier wurde eine noch wenig gebräuchliche Detergensspezies, kurzkettige Phospholipide – konkret Diheptanoylphosphatidylcholin – in Verbindung mit Hochsalzbedingungen, angewandt. In einer systematischen Untersuchung konnte bei steter Rückführung der

Detergenzmenge und gleichzeitiger Steigerung der Salzkonzentration ausgehend von einer Minimalaktivität schließlich eine ausreichend gute Aktivität der GPT mit gleichzeitig minimaler Restaktivität der GNT erreicht werden (vgl. Tab. II.1). Dieses Verfahren war erfolgreich zur Synthese von DolPP-GlcNAc₁ mit weniger als 10 % DolPP-GlcNAc₂.

Zur Synthese von DolPP-GlcNAc₂ aus DolP und UDP-GlcNAc wurde ein Solubilisierungsverfahren entwickelt (vgl. II.1), das die effektive Produktion praktisch frei von Nebenprodukten ermöglicht. Dazu wurde ein im ersten Schritt der GPI-Ankersynthese defekter Hefestamm eingesetzt, wodurch die Bildung von *N*-Acetylglucosaminy-Phosphatidylinositol, eines in Wildtypmembranen bisher angefallenen Nebenprodukts, vollständig verhindert werden konnte.

Zur Herstellung von DolPP-GlcNAc₂- β 1,4Man aus DolPP-GlcNAc₂ und GDP-Man konnte ein Solubilisierungsverfahren entwickelt werden, das die Extraktion der β 1,4-Mannosyltransferaseaktivität in hoher Effizienz und Stabilität (ein Einfrieren des Solubilisats bleibt ohne Aktivitätsverlust) ermöglicht. Zusätzlich wurde dem Reaktionsansatz Glycerin beigemischt und damit die nachfolgenden Transferasen effektiv gehemmt. Das Produkt konnte ohne Nebenprodukte in hoher Ausbeute (88 %) gewonnen werden (vgl. II.4.2.1).

Solubilisierung und Charakterisierung der GlcNAc-Transferase (GNT)

Das Ziel der Herstellung eines Solubilisats hoher Aktivität und Stabilität, wodurch künftig eine Reinigung des Enzyms möglich sein sollte, konnte erreicht werden. Der Enzymextrakt erwies sich bei 4°C stabil (86 % Restaktivität nach drei Tagen, vgl. Abb. II.6) und konnte ohne meßbaren Aktivitätsverlust bei -80°C eingefroren werden. Die Abhängigkeit der von der GNT katalysierten Reaktion $UDP-GlcNAc + DolPP-GlcNAc_1 \longrightarrow DolPP-GlcNAc_2 + UDP$ von der Proteinkonzentration zeigte Nichtlinearität (vgl. Abb. II.5) im unteren Konzentrationsbereich, was auf Di- oder Oligomerisierung und Kooperativität hindeuten könnte.

Im leicht sauren Milieu (pH 6,6) war die Aktivität um 40 % höher als bei pH 7,0. Die Langzeitstabilität des solubilisierten Enzyms war in hohem Maße abhängig von Glycerin (vgl. II.3.3). Bei Verdünnung mit glycerinfreiem Puffer war die Aktivität nach 25 h bei 4°C auf 35 % der Vergleichsinkubation mit Glycerin zurückgegangen. Weiter konnte eine Hemmung durch den Kofaktor Mg²⁺ um bis zu 40 % bei hohen Konzentrationen beobachtet werden (siehe Abb. II.7).

Untersuchungen zur N-Glykosylierung in humanen Zellen

Etablierung von Testsystemen für die cytoplasmatisch aktiven Enzyme der LLO-Synthese

Ein spezifisches Testsystem für die GlcNAc-Phosphat-Transferase (GPT) konnte aufgebaut werden (vgl. III.1 und Abb. III.1), angelehnt an die Solubilisierungsmethode bei Hefe, in dem auch die von Kean *et al.* [53] berichtete Stimulierbarkeit durch DolP-Man in vergleichbarem Umfang meßbar war (siehe Abb. III.2).

Auch ein Solubilisat der folgenden GlcNAc-Transferase (GNT) erlaubte mit dem aus Hefe gewonnenen DolPP-GlcNAc₁ als Akzeptorsubstrat einen spezifischen Test dieser Aktivität zu entwickeln (siehe Kinetik Abb. III.3).

Ferner wurde ein Testsystem aufgebaut, in dem sich alle GDP-Man abhängigen Mannosyltransferaseaktivitäten aufwärts von DolPP-GlcNAc₂- β 1,4Man, das als Substrat diente, solubilisiert testen ließen. Endprodukt dieser Reaktionskette war DolPP-GlcNAc₂Man₅ (vgl. III.3.2 sowie Abb.

III.5, III.7 und III.11). Auch die β 1,4-Mannosyltransferase ließ sich in diesem System testen – bei Verwendung von DolPP-GlcNAc₂ als Akzeptorsubstrat. Endprodukt war dann auch hier DolPP-GlcNAc₂Man₅ (siehe Abb. IV.10).

Enzymatische Charakterisierung von CDG Typ I-Fällen

Erstmalig konnte mit CDG-Ii ein Subtyp charakterisiert werden, der auf einen Defekt in einer der frühen Glykosylierungsreaktionen der LLO-Synthese, ablaufend auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran, zurückzuführen ist. Zwar konnte einerseits gezeigt werden, daß die erste Reaktion nach Aktion der β 1,4-Mannosyltransferase betroffen ist (vgl. LLO-Schema Abb. 2, Einleitung sowie Abb. III.8 und III.11) andererseits durch Komplementationsstudien mit Hefe der Verdacht bestätigt werden, daß es sich um einen Defekt im humanen Ortholog zum *ALG2*-Gen handelte (siehe Abb. III.12, III.13). Da die beiden folgenden Reaktionen jedoch die erste Verzweigung im „core“-Oligosaccharid etablieren (DolPP-GlcNAc₂- β 1,4Man(- α 1,3Man)- α 1,6Man) und es unklar war, welche Reaktion Alg2p in Hefe katalysiert (vgl. Abb. III.14), mußte zur weiteren Abklärung zunächst ein DolPP-GlcNAc₂Man₂-Substrat definierter Struktur erzeugt werden. Dies gelang durch limitierten „jack bean“-Mannosidaseverdau von DolPP-GlcNAc₂Man₅ (siehe Abb. III.10). Mit dem Ausbleiben einer Verlängerung von DolPP-GlcNAc₂- β 1,4Man- α 1,6Man im Patienten (siehe Abb. III.15) konnte dann Alg2p als die α 1,3-Mannosyltransferase identifiziert und die Synthesereihenfolge als die α 1,3-Mannosyltransferaseaktivität *vor* der α 1,6-Mannosyltransferaseaktivität bestimmt werden [114].

Ein weiterer CDG Typ I konnte mit Subtyp Ig enzymatisch als Defekt im humanen Ortholog zum Hefe *ALG12* abgeklärt werden [113], einer DolP-Man abhängigen Mannosyltransferase, verantwortlich für den Schritt von LLO-Man₇ nach LLO-Man₈ (vgl. Einleitung, Abb. 2). Im Patienten konnte zwar DolPP-GlcNAc₂Man₆ zu DolPP-GlcNAc₂Man₇, nicht aber DolPP-GlcNAc₂Man₇ zu höheren Oligosacchariden verlängert werden, wohingegen das Endprodukt in Membranen von Kontrollzellen jeweils DolPP-GlcNAc₂Man₉ war (siehe Abb. III.16).

Für einen weiteren CDG Typ I-Fall konnte ein aus der genomischen Analyse herrührender Verdacht auf einen Defekt in *RpnIip*, einer Untereinheit der humanen Oligosaccharyltransferase, ausgeschlossen werden. Dagegen wurde eine signifikante Defizienz sowohl in der DolP-Man Synthase des Patienten als auch der β 1,4-Mannosyltransferase (Alg1p) festgestellt (Abb. IV.9, IV.10).

Freeze hebt in einem CDG-Review [27] hervor, daß ein komplexes Zusammenspiel mehrerer für sich allein unbedeutender Enzymdefekte leichter Ausprägung für das Zustandekommen eines CDG-Falls wohl eher die Regel als die Ausnahme darstellen könnte. Die starken Unterschiede in der Ausprägung ein und desselben Gendefekts, wohl abhängig vom jeweiligen genetischen Hintergrund, wiesen in diese Richtung, zusammen mit der hohen Komplexität und Interdependenz der Synthesemaschinerie. Unerheblich erscheinende Defekte in einzelnen Enzymen könnten, bei Zusammenwirken im gleichen Organismus, die kritische Schwelle überschreiten und zum Krankheitsbild führen.

Hier ist möglicherweise genau dies der Fall, insbesondere da sich die Defekte in der DolP-Man Synthase und der β 1,4-Mannosyltransferase gegenseitig verstärken könnten. Dies wird unter IV.3.4 diskutiert.

Anhang A

Methoden

A.1 Kulturbedingungen

A.1.1 Kulturbedingungen für *E. coli*

Die Anzucht erfolgte bei 37°C in 2xTY-Flüssigmedium (1.6 % „Bacto Trypton“, 1 % „Bacto Yeast Extract“, 0.5 % NaCl) bzw. auf entsprechenden Agarplatten (1.5 %). Zur Plasmidselektion wurden jeweils 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

A.1.2 Kulturbedingungen für *S. cerevisiae*

Die verwendeten Hefestämme wurden in Vollmedium YEPD (1.6 % Yeast Extract, 2 % Bacto-peptone, 2 % Glucose) bei den angegebenen Temperaturen angezogen (30°C bzw. 25°C für temperatursensitive Stämme). Zur Selektion plasmidkodierter Uracil-Auxotrophiemarker wurden die entsprechenden Stämme in Minimalmedium (0.8 % „Dropout Ura“, 0.67 % „Yeast Nitrogen Base“, 2 % Glucose, 10 mg/l Adenin) inkubiert bzw. auf entsprechende Agarplatten mit 1.5 % Agar plattiert.

A.1.3 Zellkultur humaner Fibroblasten bzw. Lymphoblasten

Zellkulturtätigkeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Medien und Medienzusätze waren vor Gebrauch durch 0,22 µm Sterilfilter filtriert, Glasgeräte und Pipetten waren autoklaviert oder sterilisiert worden. Alle Medien und Waschlösungen waren auf 37 °C vortemperiert. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und in einer wassergesättigten Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luft kultiviert.

A.1.3.1 Kulturbedingungen für humane Fibroblasten

Als Medium für adhärente primäre humane Fibroblasten wurde grundsätzlich DMEM „High Glucose“ (4.5 mg/ml) mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat und Natriumbikarbonat von Gibco in Pulverform bezogen, nach Herstellerangaben in H₂O_{bidest} gelöst, mit 3.7 g/l NaHCO₃ sowie PenStrept (60 mg/l Penicillin Na-Salz ≈ 1666 U/mg; 100 mg/l Streptomycinsulfat ≈ 750 U/mg) versetzt, mit konz. HCl auf pH 7.2-7.4 gebracht, steril filtriert und bei 4°C maximal 4 Wochen aufbewahrt. Vor Verwendung wurde jeweils noch 10 % foetales Kälberserum (Pan, steril ab Hersteller) ergänzt. Die Kultivierung der adhärennten Zellen erfolgte in 175 cm² großen Zellkulturflaschen mit jeweils

35 ml Medium (DMEM H. G., 10 % FKS, s. o.!). Das Medium wurde jeweils am Tag 7 gewechselt. Bei vollständiger Konfluenz mit hoher Zelldichte (meist nach 21 Tagen ab Aussaat) erfolgte entweder Teilung 1:2 und wiederum Aussaat in 175 cm²-Zellkulturflaschen, oder aber Teilung 1:2.6 und Aussaat der Zellen je einer Flasche auf 3 Schalen mit Ø 150 mm (etwa 152 cm²). Jede Schale wurde auf ein Endvolumen von etwa 25 ml Medium gebracht (inklusive der Zellsuspension). Auch in den Schalen erfolgte am Tag 7 nach Aussaat ein Medienwechsel, da in der Regel nach dieser Zeit noch keine vollständige Konfluenz erreicht war. Am Tag 14 nach Aussaat (nur bei ausnehmend schnell wachsenden Zellen bereits am Tag 7) erfolgte dann die Ernte (siehe unten).

Das Trypsinieren der 175 cm²-Flaschen bzw. 150 mm Ø Schalen:

Nach Absaugen des Mediums erfolgte jeweils eine Waschung mit 10 ml PBS*. Anschließend kam je Flasche 5 ml, je Schale 4.5 ml eiskaltes Trypsin/EDTA (Gibco, 0,25 % Trypsin / 0,02 % EDTA) zur Anwendung. Nach kurzem Verteilen wurde 3.5 bis 4 Minuten im Kulturschrank (37°C) inkubiert, die vollständige Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert (evtl. durch etwas Klopfen nachgeholfen) und dann sofort mit 37°C-warmem Medium abgestoppt: 10 ml für die Flasche, 5 ml je Schale.

Die Teilung:

Nach Trypsinieren und Abstoppen befand sich demnach ein Gesamtvolumen von 15 ml in jeder Flasche. Durch vorsichtiges Pipettieren erfolgte eine Homogenisierung der Suspension. Davon wurden je 7.5 ml in eine neue Flasche pipettiert, die restliche Hälfte in der alten Flasche belassen. Je Flasche kamen 27.5 ml frisches Medium hinzu (Endvol. 35 ml).

Die Aussaat:

Die homogenisierten 15 ml Zellsuspension einer Flasche (nach Trypsinieren und Abstoppen) wurden auf 3 Schalen (150 mm) verteilt und mit je 20 ml frischen Mediums ergänzt.

Die Ernte:

Nach Trypsinieren der Schalen (siehe oben, Endvol. je 9.5 ml) wurde die Zellsuspension aus jeweils 3 Schalen in einem Falcon-Tube gesammelt, jede Platte mit 5 ml PBS nachgewaschen und mit der abgenommenen Zellsuspension vereinigt, bei 300 g und 32°C 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 7 ml PBS resuspendiert, gegebenenfalls zusammen mit einem weiteren Ansatz in einem 15 ml Falcon vereinigt und erneut zentrifugiert (wie oben). Nach gründlichem Absaugen des Überstands erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 0.5 ml eiskaltem Einfrierpuffer (ANP^{**}_{mod}) und der Transfer in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß. Nach kurzem Vortexen wurde in flüssigem Stickstoff „schockgefrostet“ und dann bei -80°C gelagert.

Puffer:

(*) PBS (10x, 1 l): 80 g NaCl, 2 g KCl, 7.64 g Na₂HPO₄·x2H₂O und 2 g KH₂PO₄ mit H₂O_{bidest} auf 1 l bringen. In 1x-Puffer (Autoklavieren erfolgte in dieser Form) ist der pH in der Regel wie gewünscht bei 7.2.

(**) ANP_{mod}: 30 mM Tris-Cl pH 7.5, 35 % Glycerin, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, wobei die letzteren beiden jeweils frisch zugegeben wurden.

Dauerkulturen:

Flaschen wurden trypsiniert wie oben beschrieben. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 32°C und

300 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet auf Eis „geparkt“. Je 75 cm² Zellrasen wurde das Pellet *vorsichtig* in 1 ml auf Eis vorinkubiertem Einfriermedium (DMEM High Glucose, 10 % FKS, 7.5 % DMSO) suspendiert, je 1 ml in 1 ml Nunc-Kryotubes abgefüllt (Gilson-Pipette), die Röhrchen in eine Styropor-Box überführt und bei -80°C mindestens über Nacht belassen (langsame Temperieren), um dann in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung verbracht zu werden. DMSO schädigt die Zellen um so mehr, je höher die Temperatur. Daher ist Arbeiten auf Eis essentiell.

Auftauen:

- Nach Entnahme aus N₂*flüssig* ca. 1 min bei RT halten um Platzen zu vermeiden, dann unter Schwenken im 37°C-Ethanolbad auftauen bis auf kleinen Eiskern;
- Überführen in 10 ml warmes Medium (evtl. Ampulle nachspülen) und sofort zentrifugieren (5 min 250-300 g, 32°C);
- Überstand gut absaugen und Zellen schonend in 5 ml warmem Medium resuspendieren und in 25 cm²-Flasche überführen;
- Medienwechsel am Folgetag, um DMSO-Reste und tote Zellen zu beseitigen;

A.1.3.2 Kulturbedingungen für humane Lymphoblasten

Als Medium wurde „RPMI mit L-Glutamin, ohne Natriumbikarbonat“ als Pulver von Gibco bezogen, nach Herstellerangaben mit NaHCO₃ versetzt, in H₂O_{bidest} gelöst, PenStrept zugegeben (60 mg/l Penicillin Na-Salz ≈ 1666 U/mg; 100 mg/l Streptomycinsulfat ≈ 750 U/mg) und steril filtriert. Das fertige Medium wurde maximal 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch mit 10 % foetalem Kälberserum (Pan, steril ab Hersteller) versetzt.

Die nicht adhären Zellen wurden wie folgt in Suspensionskultur genommen:

175 cm²-Flaschen mit Lüftungsmembrane im Deckel wurden mit 50 bis 70 ml Medium gefüllt (je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen) und *stehend* im Begasungsbrutschrank kultiviert. Eine Zellzahl von 10⁶/ml sollte nicht überschritten werden. Ermittelt wurde die Zellzahl nach Homogenisieren mit einer 10 ml Glaspipette mittels einer Zählkammer (Neugebauer improved). Entsprechend erfolgte eine Passage 1-2 mal pro Woche, wobei 1:3 bzw. 1:5 verdünnt wurde, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie.

Medienwechsel und Passage:

Der Flascheninhalt (50-70 ml) wurde auf 2 50 ml Falcontubes (steril) gesplittet (dekantiert, nach Homogenisierung), 7 min bei 350 g und 32°C zentrifugiert, jedes Pellet in 10 ml RPMI/FKS-Medium suspendiert und je nach gewünschtem Teilungsverhältnis auf die entsprechende Anzahl von Flaschen verteilt und je nach Wachstumsgeschwindigkeit auf 50 bzw. 70 ml Endvolumen gebracht. Zellkulturflaschen können mehrfach verwendet werden.

Kryokulturen:

Die Zellen wurden nach Zählung pelletiert wie oben beschrieben und sofort auf Eis gelagert. Zwischen 8 x 10⁶ und 10⁷ Zellen wurden in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (RPMI 10 % FKS, 7.5 %

DMSO) suspendiert wie für Fibroblasten beschrieben (A.1.3.1). Auch die weitere Prozedur entsprach diesem Protokoll.

A.2 Biochemische Methoden

A.2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungsmittelgemische

Membranaufnahmepuffer

25 mM PIPES pH 6.6; 3 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 35 % Glycerin.

Membranaufnahmepuffer^{Tris}

30 mM Tris/HCl pH 7.4; 3 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 35 % Glycerin.

Puffer A

10 mM Tris/HCl pH 7.2; 3 mM MgCl₂; 150 mM NaCl.

Synthetische „upper phase“ standard: UP 3:2:1

CHCl₃/CH₃OH/H₂O = 3:48:48

Synthetische „upper phase“ für 2:1:1-System: UP 2:1:1

CHCl₃/CH₃OH/H₂O = 0.992:32:48

A.2.2 Mikrosomenpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

A.2.2.1 Glasperlenaufschluß

Die Isolierung von Membranen erfolgte nach Lehle und Tanner (1974) durch Glasperlenaufschluß in einem Zellhomogenisator der Firma Braun (Melsungen) und anschließender differentieller Zentrifugation.

Hefen aus Flüssigkultur wurden bei OD₅₇₈ 6-8 geerntet (1200-1500 g), mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen und in Aufschlußpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 mM MgCl₂, 5 % Glycerin) resuspendiert. Die Menge an Naßgewicht der Hefezellen in Gramm entsprach der zugegebenen Menge an Aufschlußpuffer in ml. Weiterhin wurde die fünffache Menge des Naßgewichts an Glasperlen (Ø 0.45-0.55 mm) zugegeben. Die Hefezellen wurden in Aufschlußgefäßen unterschiedlicher Größe (je nach Zellmenge) im Zellhomogenisator der Firma Braun (Melsungen) 3 min unter CO₂-Kühlung aufgeschlossen, über lichtmikroskopische Kontrolle die Effektivität überprüft und über Büchnertrichter entsprechender Größe durch Papier-Rundfilter (Schleicher & Schuell Nr. 595) gesaugt und so von den Glasperlen getrennt (auf Eis, Nachwaschen mit Aufschlußpuffer). Nicht aufgeschlossene Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 1500 g im SS-34 Rotor (Sorvall) 5 Minuten pelletiert (Plastikeinsätze), der Überstand in 30 ml Corex-Gläser überführt und 30 min bei 48000 g pelletiert. Das Pellet wurde resuspendiert in Aufschlußpuffer (1 ml/2000 OD), erneut pelletiert (30 min bei 48000 x g, 4 °C) und in Membranaufnahmepuffer pH 6.6 PIPES (A.2.1, 1 ml/2000 OD) resuspendiert und homogenisiert (Glaspotter der Firma Braun). Membranen, die für OST-Tests oder zur Produktion von DolPP-GlcNAc₁ (GPT-Aktivität) vorgesehen waren, wurden dagegen in

Membranaufnahmepuffer_{Tris} pH 7.4 (A.2.1) resuspendiert. Alle Schritte ab Zellernte erfolgten auf Eis oder 4°C. Die Lagerung der Rohmembranen erfolgte bei -80°C.

A.2.2.2 Spheroblastierung nach L. Lehle

- Anzucht von Hefezellen auf Voll- oder Minimalmedium bis OD₅₇₈ 1-2, 1-2.5 Liter;
- Zentrifugation GS3 Rotor (Sorvall) 5 min, 3000 g;
- Zellen 2x waschen mit H₂O_{bidest} steril, Naßgewicht bestimmen;
- Zellen resuspendieren in 100 mM Tris-Sulfat, pH 9.4, 10 mM DTT: 2 ml/g;
- Inkubation 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln, 100 rpm;
- Zellen ernten und 1x waschen mit 1.2 M Sorbit, 5 mM DTT, 20 mM K-Phosphat Puffer, pH 7.4;
- Zellen resuspendieren (5 ml/g) in Spheroblasten-Medium* mit Zymolyase (20 U/ml);
- Inkubation bei 30°C unter leichtem Schütteln;
- Spheroblastierung verfolgen durch Abnahme der A₅₇₈: jeweils 0.01 ml Probe in 1 ml H₂O; Messung bei Start und dann in Abständen von 10 min; A₅₇₈ sollte zur Lyse etwa 10 % gegenüber dem Ausgangswert betragen.
- Spheroblasten auf Eis abkühlen; Zentrifugation im SS-34-Rotor (Sorvall) 5 min 5000 rpm (3000 g);
- 2x waschen in Spheroblasten-Medium*;
- Spheroblasten aufnehmen in kaltem Lysispuffer**;
- Pottern mit Dounce-Homogenisator, etwa 15-20 „strokes“;
- Zentrifugation im SS-34-Rotor, 5min bei 3600 rpm (1500 g);
- Überstand (1) abheben und aufbewahren;
- Niederschlag in gleicher Menge Lysispuffer wie beim ersten Mal aufnehmen und erneut pottern;
- Zentrifugation im SS-34-Rotor, 5 min bei 3600 rpm (1500 g);
- Überstand (2) abheben;
- Pellet nochmals wie oben pottern und zentrifugieren;
- Überstände (1), (2) und (3) vereinigen und 20 min bei 15700 rpm (30.000 g) im SS-34-Rotor zentrifugieren;
- Niederschlag aufnehmen in Lysispuffer, ursprüngliches Lyse-Volumen (= 1 Vol. Membranen);

- Zentrifugation durch 2 Vol. Glycerinkissen (Storage buffer***), 15 min bei 18.000 rpm (40.000 g);
- Pellet aufnehmen in Storage buffer, Menge je nach Hefezellen;
Sollten noch „ghosts“ im Mikroskop sichtbar sein, dann wie folgt verfahren:
- Membranen mit Lysispuffer verdünnen (ca. 10 ml) und 10 min bei 1500 g zentrifugieren;
- Überstand abheben und 20 min bei 30.000 g erneut zentrifugieren;
- Membranpellet in Storage buffer aufnehmen;

Lösungen:

- (*) Spheroblasten-Medium: 50 % YEPD, 1,2 M Sorbit, 5 mM DTT, 20 mM K-Phosphat-Puffer pH 7.4;
- (**) Lysispuffer: 50 mM K-Acetat, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 20 mM Hepes pH 7.4;
- (***) Storage buffer: 20 mM Hepes pH 7.4, 50 mM K-Acetat, 14 % Glycerin, 1 mM DTT;

A.2.3 Membranpräparation aus primären humanen Fibroblasten

Die bereits in 35 % Glycerin und Proteaseinhibitoren enthaltenden Puffer eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit diesem hypertonen Puffer (ANP_{mod}, vgl. A.1.3.1) noch weiter verdünnt (ca. 1,8 ml), intensiv gevortext, 15 Minuten auf Eis inkubiert (bereits hier teilweise Permeabilisierung) und bei 48.000 g und 4°C 20 Minuten pelletiert. Nach sauberem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet zunächst in 500 µl hypotonischem Puffer (10 mM Tris/Cl pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin) aufgenommen (dabei mit Pipettenspitze vom Cup gelöst, ohne aber einzusaugen), mit dem dicken Ende eines Eppendorf-Kunststoffpotters gründlich homogenisiert, weitere 800 µl hypotonischen Puffers ergänzt (Abspülen des Potters), gevortext, in ein 1,5 ml original Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut 20 Minuten bei 4°C und 48.000 g pelletiert. Dieses Pellet schließlich entsprach der Rohmembranfraktion, die in etwa 150 µl Membranaufnahmepuffer_{Tris} A.2.1 pro 3 Ø 150 mm-Schalen suspendiert (umgebogene Pipettenspitze, zunächst nur mit Puffer bedecken, dann mit Pipettenspitze Pellet von Wand lösen, schließlich unter Herausbewegen der Spitze den Rest des Puffers ausstoßen) und erneut mit einem Eppendorf-Kunststoffpotter (schlanke Seite) gründlich homogenisiert wurde. Die Membranfraktion wurde bei -80°C eingefroren und gelagert.

A.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit dem verbesserten Bradford-Reagens von Pierce („Coomassie Plus Protein Assay Reagent“) nach Herstellerangaben bestimmt. Abweichungen davon sind im Text angegeben. Für einen Standardtest des Proteingehalts von Membranen wurde eine 1:20-Verdünnung in H₂O angefertigt (5 µl Membranen + 95 µl H₂O), im Ultraschallbad kurz homogenisiert und davon (Zimmertemperatur) je einmal 20 µl und einmal 35 µl auf Proteingehalt untersucht und das arithmetische Mittel gebildet. Gemessen wurde gegen eine programmierte Eichkurve (Eppendorf Biophotometer), die jeweils bei Wechsel der Reagens-Charge neu angefertigt worden war:

nichtlineare Regression. Um Samples unterschiedlicher Messungen sicher miteinander vergleichen zu können, wurde grundsätzlich ein 10 μ g BSA-Standard mitbestimmt. Es wurde der Bruch aus Sollwert (10 μ g) und Istwert (x μ g) gebildet und alle Meßwerte mit diesem Faktor korrigiert.

A.2.5 „Western-Blot“-Analyse

Als Proteinquelle dienten je Spur 25 μ g Membranprotein, das wie unter A.2.2.1 gewonnen worden war. Für die Auftrennung von OST3/Ost6 über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli und King 1970 [76]) war nur bei Einsatz von DTT im Probenpuffer (10 mM für 1x, 5 Minuten 95°C) das Auftreten von Artefaktbanden zu vermeiden.

Das Blotting erfolgte unter Anwendung des „Semi-Dry“-Verfahrens [75] mit einer Apparatur der Firma BioRad bei maximal 25 V und

Anti-Ost6p: 10 min 250 mA, 1 h 20 min 200 mA, 10 min 250 mA.

Anti-Ost3p: 1 h 15 min bei 240 mA.

Vor dem Blotting erfolgte eine 5 min-Äquilibration im verwendeten Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol und 0.037 % SDS). Geblottet wurde auf Nitrozellulose BA-S85 (Schleicher & Schüll). Zum Färben des Proteinstandards diente 0.2 % Ponceau S (Sigma) in 3 % Trichloressigsäure und 3 % Sulfosalicylsäure, entfärbt wurde mit H₂O_{dest.}

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen erfolgte ein „Blockieren“ in „Blocking-Puffer* +Tween“ (BP+T) und 5 % Magermilchpulver über 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach kurzem Waschen in BP-T erfolgte die Antikörperinkubation (primärer 2 h RT oder über Nacht bei 4°C), indem der Blot auf Parafilm wie folgt überschichtet wurde:

Anti-Ost6p [66]: Verdünnung 1:2000 in Blocking-Puffer mit 5 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Gibco);

Anti-Ost3p [66]: Verdünnung 1:150 wie oben; zur Erhöhung der Spezifität erfolgte Vorinkubation auf einem Western mit Membranproteinen aus dem *ost3Δ*-Stamm.

Es folgte eine 15 min-Waschung mit BP+T, 1 % Magermilchpulver sowie 2x 15 min-Waschung mit BP-T, jew. bei Raumtemperatur. Die Dekoration mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase) erfolgte durch Überschichten mit einer 1:5000-Verdünnung in BP-T und 1 % Magermilchpulver 1 h bei RT. Nach Wiederholung der 3 oben genannten Waschschrte wurden die gebildeten Antikörperkomplexe mit dem „ECL Western Blotting Detection System“ der Firma Amersham durch Chemilumineszenz nach Herstellerangaben detektiert.

Zur Ablösung der Antikörper aus den Komplexen mit deren Zielproteinen und Neudekoration mit anderen primären Antikörpern wurde die Membran 30 min bei 50°C in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7, 100 mM Mercaptoethanol und 2 % SDS inkubiert. Nach 2x 10 min Waschen mit Blockierlösung konnte die Membran, beginnend mit der Blockierung, neu dekoriert werden.

(*) Blockingpuffer: TBS (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) \pm Tween 0.2 %, \pm Magermilchpulver (1 bzw. 5 %).

A.2.6 „Blue Native Page“ und „Western Blotting“

In dieser Arbeit werden keine neuen Experimente, sondern noch unveröffentlichte Ergebnisse von Herrn Dr. Roland Knauer neu interpretiert und präsentiert. Die Methodik wurde bereits in [66] geschildert.

A.2.7 Lipidoligosaccharid-Markierung mit [^3H]-Mannose

Die Synthese von Dol-PP-GlcNAc₂[^3H]-Man₅₋₇ bzw. von Dol-PP-GlcNAc₂[^3H]-Man₉Glc₃ erfolgte über *in vivo*-Markierung ganzer Hefezellen mit [^3H]-Mannose: RKY326 (*ost3Δ/ost6Δ*) für LLOMan₉Glc₃; *alg3Δ* für LLOMan₅; *alg9Δ* für LLOMan₆ sowie *alg12Δ* für LLOMan₇. Je 40 OD₆₀₀ Einheiten einer logarithmischen Hefekultur in Vollmedium wurden geerntet, einmal mit Vollmedium ohne Glucose (YEP) gewaschen, in 200 μl YEP aufgenommen und mit 100 μCi [^3H]-Mannose 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Markierung wurde mit 4 ml C/M 3:2 gestoppt und die Zellen 5 min bei 1200 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet dreimal mit je 3 ml C/M 3:2, zweimal mit je 3 ml „upper phase“ mit MgCl₂ (48 % (v/v) Methanol, 3 % (v/v) Chloroform, 4 mM MgCl₂) zweimal mit je 3 ml „upper phase“ ohne MgCl₂ (UP 3:2:1, A.2.1) und dreimal mit je 3 ml C/M/H 10:10:3 (v/v/v) extrahiert. Die CMH-Extrakte wurden jeweils vereinigt, unter N₂ bei 37°C eingeblasen, in 1 ml C/M/H 10:10:3 (v/v/v) aufgenommen und die Radioaktivität bestimmt. Handelte es sich um eine analytische LLO Markierung, wurde der Ansatz mit 0,02N HCl mildsauer hydrolysiert (A.2.11.9) und die Oligosaccharide über HPLC analysiert. Sollten die Lipidoligosaccharide in einen Enzymtest eingesetzt werden, wurde nur ein Aliquot hydrolysiert und über HPLC analysiert wie unter A.3.1 beschrieben.

Zur Analyse der kurzkettigen LLO-Fraktion wurden die C/M 3:2-Extrakte gepoolt, eingeblasen und den C/M/H 10:10:3-Extrakten entsprechend analysiert.

A.2.8 Präparative und analytische Mannosidase-Verdaue

A.2.8.1 Präparativer LLO[^3H]-Man₅-Verdau durch *Jack bean* α -Mannosidase zur LLOMan₂-Gewinnung

- Für eine 15 μl -Inkubation wurden 40600 cpm LLO[^3H]-Man₅ im 200 μl PCR-tube eingeblasen, mit 10 μl 1.5x Natriumacetat-Puffer (dem Enzym beige packt: 1x mit 100 mM CH₃COONa pH 5.0, 2 mM Zn²⁺) im Ultraschallbad drei mal 10 sec. mit Zwischenkühlung dispergiert und mit 5 μl Enzymverdünnung (7.5×10^{-4} U/ μl) 50 Minuten im Thermomixer mit Deckelheizung bei 37°C inkubiert.
- Aufarbeitung: Zur Substratgewinnung fanden entsprechend viele Einzelinkubationen statt. Jede Einzelinkubation wurde mit 100 μl C/M 1:1 abgestoppt (C/M/H 10:10:3). Je 5 Ansätze wurden gepoolt im 1.5 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß und mit 250 μl CHCl₃ sowie 175 μl H₂O auf C/M/H 2:1:1 gebracht, Folch verteilt und 225 μl „upper phase“ abpipettiert. Der Rest wurde noch 2x mit je 225 μl UP 2:1:1 (A.2.1) nachverteilt und jeweils wieder das gleiche Volumen an upper phase abgenommen. Die verbliebene lower und inter phase wurden unter N₂ eingeblasen, in 400 μl C/M/H 10:10:3 aufgenommen, über 0.45 μm Durapore Membran (Amicon) filtriert, erneut unter N₂ eingeblasen, in nunmehr 150 μl C/M/H 10:10:3 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Um das LLOMan₂-Substrat in einer Elongationsreaktion einzusetzen, wurde ein Prämix wie folgt präpariert (5x):

150 μl LLOMan₂ wurden unter N₂ eingeblasen (500 μl PCR-tube), mit 18.7 μl 0.25 % NP40 im US-Bad dispergiert (3x 10 sec. mit Zwischenkühlung) und mit 44.1 μl Citrat/Phosphat Reaktionspuffer pH 6.9 gemischt. Lagerung bei -20°C; je Reaktion 12 μl Prämix.

A.2.8.2 Analytischer α 1,3-Verdau des durch mildsaure Hydrolyse vom Dolicholrest abgetrennten Tetrasaccharids

Verdau mit einer $\text{Man}\alpha$ 1-2,3 Man spezifischen Mannosidase rekombinant aus *E. coli* von *Calbiochem*:

Nach mildsaurer Hydrolyse von LLOM₂ (A.2.11.9) wurde das Tetraoligosaccharid in einem 200 μl PCR-tube eingeblasen (N_2), in 10 μl 150 mM CH_3COONa pH 5.0, 7.5 mM Ca^{2+} aufgenommen und mit 10 U Mannosidase (5 μl Enzym wie geliefert) 24 h bei 37°C verdaut. Die α 1,3-Mannosidaseaktivität unter den angegebenen Bedingungen war zuvor erfolgreich getestet worden. Aufarbeitung:

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 170 μl UP 3:2:1 (A.2.1) gestoppt, die homogene Phase in ein 1.5 ml Filter-tube (0.45 μm Durapore Membran Amicon) überführt, nachgewaschen mit 190 μl UP 3:2:1 und das Gesamtextrakt filtriert, eingeblasen, in je 30 μl Millipore- H_2O aufgenommen und über HPLC analysiert (A.3.1).

A.2.8.3 Analytischer α 1,6-Verdau des durch mildsaure Hydrolyse vom Dolicholrest abgetrennten Tetrasaccharids

Verdau mit einer $\text{Man}\alpha$ 1-6 Man -spezifischen Mannosidase rekombinant aus *E. coli* von *Calbiochem*:

Nach mildsaurer Hydrolyse (A.2.11.9) von LLOM₂ wurde das eingeblasene Tetrasaccharid in einem Endvolumen von 15 μl in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 5.0 mit 1.125 mU Enzym bei 37°C 3.5 h verdaut.

Aufarbeitung wie unter A.2.8.2 beschrieben.

A.2.8.4 Analytischer β 1,4-Verdau des präparativ hergestellten, präsumptiven DolPP [^{14}C]-GlcNAc₂ β 1,4 Man

Als β 1,4-spezifische Mannosidase diente das Enzym aus *Helix pomatia* (Glyko, UK).

Verdau des freien Oligosaccharids nach mildsaurer Hydrolyse (A.2.11.9) 9000 cpm Oligosaccharid wurden in 32 μl 100 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4.0 aufgenommen. 16 μl Kontrollinkubation; 16 μl wurden mit 4 μl Enzym (0.02 u/ μl) bei 37°C 16 h verdaut (0.004 u/ μl , ca. 0.77 μM Substrat). Die Reaktion wurde mit 350 μl UP 3:2:1 (A.2.1) gestoppt und denaturiertes Protein durch Filtration über 0.45 μm Durapore Membran (Amicon) beseitigt. Nach Einblasen unter N_2 Aufnahme in 30 μl H_2O . Dünnschichtanalyse unter Std.-Bed. (A.2.11.2), Laufmittel Aceton/n-Butanol/ H_2O 70/15/15, 2x entwickelt.

Verdau des lipidgebundenen Oligosaccharids 6000 cpm [^{14}C]-LLOM₁ wurden im PCR-tube eingeblasen, mit 7.14 μl 0.25 % NP40 nach N_2 -Begasung im Ultraschallbad suspendiert und mit dem mitgeliefertem Citrat/Phosphatpuffer auf ein Endvolumen von 24 μl gebracht (100 mM Citrat/Phosphat pH 4.0). Der Verdau erfolgte mit 6 μl Enzym (0.02 u/ μl) in einem Endvolumen von 30 μl bei 37°C über 16 h (0.004 u/ μl , ca. 0.68 μM Substrat). Die Reaktion wurde mit 600 μl C/M 2:1 gestoppt, mit 170 μl H_2O auf C/M/H 2:1:1 gebracht und nach Standardbedingungen Folchverteilt (2x Waschen mit je 200 μl UP 2:1:1, A.2.1). Interphase und lowerphase wurden zusammen eingeblasen unter N_2 , aufgenommen in 300 μl C/M 1:1, filtriert (Amicon) um ausgefallenes Protein zu beseitigen, erneut eingeblasen und aufgenommen in 30 μl C/M 1:1. Dünnschichtanalyse unter Std.-Bed. (A.2.11.2), Laufmittel C/M/H 65:25:4.1.

A.2.9 Metabolische Markierung von Hefen und Immunpräzipitation von CPY bzw. Invertase

A.2.9.1 Markierung mit [^{35}S]-Methionin und Zellaufschluß

- Anzucht in Vollmedium, 2 % Glucose.
- Ernte von 20 OD₅₇₈ Zellen je Ansatz aus logarithmischer Kultur.
- Einmaliges Waschen mit YNB, 0.1 % Glucose und Dereprimierung in 5 ml des gleichen Mediums bei 30 bzw. 25 und 35°C (TS-Phänotyp!) im Wasserbadschüttler.
- Nach 30 min Zugabe von 114 μCi [^{35}S]-Methionin je Ansatz zur Markierung.
- Nach 30 min Zugabe von je 0.2 mg/ml kalten Methionins; weitere 30 min schütteln.
- Zellernte und Absaugen des radioaktiven Überstandes.
- Waschen der Zellen mit 5 ml 10 mM Na-Azid.
- Resuspendieren in 200 μl Aufschlußpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin) und Überführen in Fiolaxgläschen mit je 0,75 g Glasperlen (\varnothing 0.45-0.55 mm).
- Zellaufschluß bei 4°C im Reagenzglasschüttler und maximaler Drehzahl, 10 min.
- Ernten der Zellsuspension mit ausgezogenen Pasteurpipetten und Überführen in Eppendorf-Cups.
- 20 min Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge (SS-34-Rotor, 4°C, 48000 g).
- Überführen des Überstands in neues Eppendorf-Cup und Einstellen einer SDS-Konzentration von 1 %.
- Denaturierung bei 95°C, 5 min.

A.2.9.2 Immunpräzipitation

- Inkubation des denaturierten Überstandes (siehe oben) mit 1 ml TNET-Puffer und 7 μl (CPY) oder 5 μl (cytoplasmatische Invertase) Antikörper bei 4°C über Nacht.
- 30 min Zentrifugation in Sorvall-Zentrifuge (SS-34-Rotor, 4°C, 48000 g).

Isolierung des Antigen-Antikörperkomplexes mit Hilfe von Protein A-Sepharose:

- Je Ansatz 5 mg Protein A-Sepharose in 1 ml TNET-Puffer 30 min bei 4°C quellen lassen.
- Waschen mit 1 ml TNET-Puffer, Abzentrifugieren, Verwerfen des Überstands und Zugabe des Antigen-Antikörperkomplexes.
- Bewegen der Protein A-Sepharose mit dem Antigen-Antikörperkomplex bei 4°C (rollern!), 2 h.

- Abzentrifugieren der sepharosegebundenen AG-AK-Komplexe (Überstände für eventuelle Fällung mit dem anderen Antikörper aufbewahren!).
- Viermaliges Waschen mit TNET-Puffer.
- Einmaliges Waschen mit Tris-Saline.
- Trennung der Sepharose vom AG-AK-Komplex: je Ansatz zweimaliges, fünf-minütiges Erhitzen auf 95°C mit je 25 µl SDS-Probenpuffer.
- Auftragen der vereinigten Überstände jedes Ansatzes auf ein 10 %- (Invertase) bzw. 8 %- (CPY) SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970 [76]).
- Lauf bei 35 mA.
- Zur Signalverstärkung vor Trocknung 30 min in Fluoreszenzlösung (Amplify, Amersham) schwenken; Exposition des Röntgenfilms: 2-3 Tage.

TNET-Puffer pH 7,5: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
 3 mM EDTA
 150 mM NaCl
 1 % Triton X-100

Tris-Saline: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
 100 mM NaCl

SDS-Probenpuffer:	15,63 Vol%	1 M Tris-HCl pH 6,8
	15,63 Vol %	H ₂ O
	31,25 Vol %	Glycerin
	31,25 Vol %	10 % SDS-Lösung
	3,13 Vol %	2-Mercaptoethanol
	3,13 Vol %	Bromphenolblau

A.2.10 Enzymatische Reaktionen *S. cerevisiae*

A.2.10.1 Solubilisierung der Oligosaccharyltransferase aus *S. cerevisiae*

$[P]_{\text{zur Solubilisierung}} = 6,47 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; $D/P = 1,66 \text{ nmol}/\mu\text{g}$; $[\text{NaCl}] = 1,2 \text{ M}$;

Für ein Endvolumen von $150 \mu\text{l}$ erfolgte folgender Ansatz:

- $x \mu\text{l}$ Membranen ($971 \mu\text{g}$ Protein) in Membranaufnahmepuffer_{Tris} pH 7.4 (A.2.1)
- $+ x \mu\text{l}$ Membranaufnahmepuffer_{Tris}
- $+ 45 \mu\text{l}$ 4 M NaCl (Vortexen)
- $+ 12,95 \mu\text{l}$ 7,5 % NP40 (unter Vortexen zugeben)

$\Sigma = 150 \mu\text{l}$

20 Minuten Solubilisierung auf Eis mit unterbrechendem Vortexen und Ultrazentrifugation bei 2°C und 207.000 g . Das klare Solubilisat wurde abgenommen und als Enzymextrakt eingesetzt.

Eine höhere Enzymkonzentration/Aktivität läßt sich durch Solubilisierung bei $[P] = 11,55 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ unter Verwendung von 10 % NP40 bei sonst gleichen Bedingungen ($D/P = 1,66$ / $[\text{NaCl}] = 1,2 \text{ M}$) erreichen, wofür gegebenenfalls die Membranpräparation aufkonzentriert werden muß.

A.2.10.2 N-Oligosaccharyltransferasetest

Der Test erfolgte in leichter Abwandlung des Protokolls von Sharma *et al.* [108]. Hier wurden stets Membranen in Membranaufnahmepuffer_{Tris} eingesetzt, also pH 7.4. Prinzipiell wurde die Reaktion in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ durchgeführt. Die eingesetzten Membranprotein- bzw. Solubilisatmengen sind an Ort und Stelle vermerkt, ebenso die jeweiligen Peptidkonzentrationen. Wurden als Donorsubstrat $[^{14}\text{C}]$ -markierte LLOs verwendet, waren im allgemeinen 3000-4000 cpm ausreichend, bei Verwendung $[^3\text{H}]$ -markierter LLOs wurden 5.000-10.000 cpm netto eingesetzt. Eventuell vorhandenes Restvolumen wurde aufgefüllt mit Membranaufnahmepuffer_{Tris}. Sowohl das Peptid- als auch das LLO-Substrat kam in Form eines Prämixes zum Einsatz, wie im Folgenden aufgeführt.

LLO-Prämix für 25 Tests:

- Einblasen von 125-250.000 cpm LLO $[^3\text{H}]\text{Man}_9\text{Glc}_3$ bzw. 100.000 cpm DolPP $[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}_2\text{-Man}_{0/1}$ in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß;
- Leicht vortexen mit $150 \mu\text{l}$ Triton X-100 10 % und kurzes Beschallen im Ultraschallbad nach Überblasen mit N_2 ;
- Mischen mit $125 \mu\text{l}$ Tris/Cl pH 7,2-7,4;
- Zugabe von $12,5 \mu\text{l}$ MnCl_2 1 M;
- Lagerung bei -20°C ; je Reaktion 7,5-10 μl ;

Hexapeptidprämix YNLTSV (synthetisch) 10 mM:

- 4 mg Peptid in 310 μl H_2O suspendieren, Ultraschallbad bis zum Zerfall jeglicher Partikel;
- + 125 μl DMSO, Mischen;
- + 20 μl Triton X-100 10 %, Mischen;
- + 30 μl 1 N HCl (Säuresprung), Mischen;
- Mit 1 N NaOH nachtitrieren bis pH 7,0-7,4 (Spezial-pH-Papier Merck);
- Mit H_2O auf 570 μl bringen;
- Aufbewahrung im Kühlschrank.

Hexapeptidprämix YNSTSV (Synthese durch Sigma Genosys) 10 mM: Hier wurde weder Detergens noch DMSO verwendet, da das Peptid relativ gut in H_2O löslich ist. Jedoch mußte mit 3 kurzen Ultraschall-Sequenzen nachgeholfen und anschließend vom initial sauren pH mit 1 M NaOH auf pH 7-7,4 titriert werden.

14er-Peptid GGHRRASVYNSTSV (Synthese durch Sigma Genosys): Dieses Peptid enthält eine Nickel-Bindedomäne (GGH), eine Phosphorylierungssequenz (RRAS*V), ein Tyrosin sowie das sehr effektive Glykosylierungs-Sequon NST und war für Crosslinking-Experimente (Nickel induziertes, oxydatives Crosslinking von Tyr [7, 23]) konzipiert worden - die aus Zeitmangel zunächst nicht weiterverfolgt und schließlich durch aktuelle Veröffentlichungen überholt wurden. Nichtsdestotrotz weist es beste Akzeptoreigenschaften auf und ist daher als Akzeptorsubstrat ideal. Es ist sehr gut löslich in H_2O , wahrscheinlich zyklisiert es aber zügig nach Lösung (Ni^{2+} -Bindefähigkeit geht verloren, bleibt aber bei Anwesenheit von Ni^{2+} lange erhalten \rightarrow tief oranger Komplex) und kann bei leichtem Erwärmen auch intermolekular reagieren (wahrscheinlich Angriff der nucleophilen freien Glycin-Aminogruppe am Guanidinium-C eines der Arginine. Die intramolekulare Reaktion stört die Eigenschaft als Akzeptorsubstrat nicht im mindesten, die intermolekulare Reaktion kann durch Zugabe von DMSO/Triton wie bei (YNLTSV) verhindert werden. Daher wurde ein entsprechender Prämix hergestellt (ohne pH-Sprung, nur Neutralisierung durch NaOH), der bei 4°C lange Zeit stabil ist.

Wurden innerhalb einer Versuchsreihe unterschiedliche Peptidmengen eingesetzt, war eine Lösung entsprechend dem jeweiligen Prämix, aber ohne Peptid, bereit und jene Ansätze mit geringerem Peptidvolumen mit diesem „Peptid-LM“ auf das maximal eingesetzte Volumen gebracht worden. In Negativkontrollen ganz ohne Peptid wurde ebenfalls eine entsprechende Menge dieses „Peptid-LMs“ eingesetzt um eine repräsentative Verteilung des LLOs zu gewährleisten.

In Ansätzen mit dem Vollängen LLO DoIPPGlcNAc₂Man₉Glc₃ war überdies eine Implementation von 1.3 mM 1-Deoxynojirimycin Hydrochloride (2 μl einer 32,5 mM Stammlösung) erfolgt, einem Glucosidase-Hemmer (Calbiochem).

Im Allgemeinen war die Reaktion in Fiolaxgläschen bei 24°C H_2O -Bad erfolgt. Für Inkubationen mit **kurzkettigen LLOs bis LLOM₁** wurde mit 2x 1 ml C/M 3:2 abgestoppt und mit 350 μl

H₂O Folch verteilt (gründliches Vortexen und 5 min Zentrifugation bei 1.200 g). Die obere polare, das Glykopeptid enthaltende, Phase wurde in Szintillationsgläsern überführt, getrocknet, mit 400 µl H₂O versetzt und mit einem hydrophilen Szintillationscocktail gezählt. Die Counts einer entsprechend lang inkubierten 0-Kontrolle ohne Peptid wurden jeweils subtrahiert.

Für **längerkettige LLOs** als Donorsubstrat enthaltende Ansätze wurde mit 1,8 ml C/M 2:1 abgestoppt, mit 600 µl H₂O Folch verteilt (10 min Zentrifugation bei 1.200 g), vorsichtig 600 µl der „upper phase“ in ein Szintillationsgefäß abpipettiert (so wenig wie möglich eintauchen, keine Turbulenzen, relativ starke Interphase bleibt zurück), noch 3 mal auf die gleiche Weise mit 600 µl „UP 2:1:1 (A.2.1)“ nachverteilt und jeweils wieder 600 µl der Oberphase mit den Vorigen vereinigt. Wie oben erfolgte Trocknung und Auswertung über Szintillationszählung. Die Counts einer entsprechend lang inkubierten 0-Kontrolle ohne Peptid wurden jeweils subtrahiert.

A.2.10.3 Synthese von DolPP[¹⁴C]-GlcNAc₁

Solubilisierung Eine 200 mM Stammlösung Diheptanoylphosphatidylcholin (Sigma) wurde wie folgt hergestellt:

Die erforderliche in CHCl₃ gelöste Substanzmenge für 0.5 ml Dispersion wurde im Pyrex eingeblasen, mit 0.5 ml Puffer (150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl pH 7.5) versetzt, gevortext, mit N₂ überblasen und in einem Branson Ultraschall-Becher mit Durchflußkühlung beschallt: etwa 10 Pulse kürzester Dauer und maximaler Intensität. Als Lichtschutz wurde Alufolie um das Glas gelegt. Lagerung bei -20°C.

Für die quantitative Synthese wurden bis zu 14 5-fach Inkubationen durchgeführt. Entsprechend muß das folgende Protokoll multipliziert werden. Bei größeren Mengen wurde die Solubilisierung im Reagensglas auf Eis vorgenommen und dann zur Zentrifugation auf eine entsprechende Anzahl Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Eine 5x-Solubilisierung ([P] = 6.48 µg/µl; DHPC/P = 0.45 nmol/µg; [NaCl] = 1.5 M) wurde wie folgt durchgeführt:

- 1.873 mg Membranprotein in Membranaufnahmepuffer_{Tris} (A.2.1);
- Mit Membranaufnahmepuffer_{Tris} auf Volumen von 177 µl bringen;
- Unter Vortexen 108.5 µl NaCl 4 M zugeben;
- Unter Vortexen mit 4.21 µl 200 mM DHPC versetzen und 20 Minuten auf Eis solubilisieren.
- 40 Minuten bei 2°C und 200.000 g zentrifugieren.

Das klare Solubilisat wurde abgenommen und unmittelbar in der Reaktion eingesetzt.

5xReaktion Für eine 5-fach Reaktion (16 mM MgCl₂; 0.25 µCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc; 0.078 µg/µl DolP) wurden in einem Reagensglas 250 µl Solubilisat mit 86 µl Prämix* gemischt und 45 Minuten bei 24°C inkubiert, mit 2 mal 2 ml C/M 3:2 abgestoppt und mit 470 µl MgCl₂ 4 mM Folch verteilt: Nach Vortexen und 5 Minuten Zentrifugation bei 1.200 g wurde die Oberphase abgenommen und noch 2 mal mit UP 3:2:1 (A.2.1) nachgewaschen. Die lower phases wurden gesammelt, ein Äquivalent einer 1x Reaktion abgezweigt und auf Dünnschicht analysiert: Silica G60, C/M/H₂O 65:25:4. Analyse über TLC-Scanner (Proportionalzählrohr). Die verbliebene vereinigte lower phase wurde unter N₂ eingeblasen und in C/M 1:1 konzentriert aufgenommen. Lagerung bei -20°C im fest verschlossenen Pyrex.

(*) **UDP-[¹⁴C]GlcNAc/DolP-Prämix mit 1.5x DolP** Für 41 Reaktionen (0.05 μ Ci, 5.25 μ g DolP je Reaktion):

- 107.6 μ l DolP (in C/M 1:1) einblasen (1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß);
- Aufnehmen in 295.2 μ l NP40 2.5 %: Vortexen, 3x 15 sec. Ultraschallbad mit Zwischenkühlung (vorher mit N₂ überblasen);
- Mischen mit 410 μ l [Tris/HCl 50 mM pH 7.5, 100 mM MgCl₂];
- 2.05 μ Ci UDP-[¹⁴C]GlcNAc einblasen (Eppendorf) und in DolP-Lösung aufnehmen (Vortexen).
- 17.2 μ l je 1x Reaktion; Lagerung bei -20°C;

Gesamtausbeute aus 67 Reaktionen: 1.156.480,0 cpm, entsprechend etwa 15.5 % der eingesetzten Radioaktivität in Form von UDP-[¹⁴C]GlcNAc.

Vergleiche aber Optimierungsvorschläge am Ende von Abschnitt II.2.2!

A.2.10.4 Synthese von DolPP[¹⁴C]-GlcNAc₂

Solubilisierung: [P] zur Solub. = 16,8 μ g/ μ l; Membranprotein aus *gpi1-8*; D/P = 2,5 nmol/ μ g, also 42 mM Detergens, entsprechend 2,53 % NP40; Endvolumen zur Solubilisierung bei Einsatz von 16,8 mg Membranprotein = 1,0 ml; die Solubilisierung erfolgte in einem 1,5 ml Polypropylen-Beckmann-UZ-Tube wie folgt:

- Ein 16,8 mg Protein entsprechendes Membranvolumen vorlegen: Das Membranendvolumen muß 747 μ l betragen und wird entweder durch Hinzufügen von Membranaufnahmepuffer (A.2.1), oder durch 10 min Pelletieren bei 80.000 g (2°C), Entfernen einer entsprechenden Menge Überstands und Resuspendieren im verbliebenen Überstand erreicht;
- Mit 253 μ l NP40 10 % solubilisieren: Unter Vortexen zugeben, 20 min auf Eis solubilisieren, unterbrochen von mehrfachem Vortexen.
- 40 min Zentrifugation bei 150.000 g und 2°C;
- Solubilisat abnehmen, in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen, kurz mischen und wie im Folgenden beschrieben in die Reaktion einsetzen;

Für 5-fach-Reaktion (durchgeführt in Reagensglas von ca. 1,5 cm Ø):

- 86 μ l Prämix in Reagensglas unter N₂ einblasen;
- + 300 μ l Solubilisat: gut vortexen, um PM zu lösen;
- 35 min Reaktion bei 24°C, evtl. zu Anfang nochmals kurz vortexen um PM sicher zu lösen;
- Chase mit 83 μ M kaltem UDP-GlcNAc: 4,43 μ l einer 6 mM-Lösung;
- Stop nach 45 min mit je 2x 2 ml C/M 3:2;

Aufarbeitung:

- Folch-Verteilung mit 0,5 ml MgCl_2 4 mM (gründlich Vortexen, 5 min 1.200 g);
- Oberphase abnehmen und verwerfen;
- Entsprechend noch 2x mit je 1 ml UP 3:2:1 (A.2.1) nachverteilen;
- Unterphase erst mit blauer Spitze absaugen (bulk), dann Rest mit ausgezogener Pasteur-Pipette; Unterphasen mehrerer 5x-Ansätze in Reagensglas sammeln, unter N_2 zur Trockne einblasen und Aufnehmen in etwa 0,9 ml C/M 1:1 pro 15 Reaktionen (3x 5-fach).
- Zählen eines Aliquots (10 μl) im Szintillationszähler und Analyse von ca. 3.000 cpm auf Dünnschicht (A.2.11.2);

Prämix für 41 Reaktionen:

- 71,75 μl DolP 2 mg/ml einblasen in Eppi;
- + 295,2 μl NP40 2,5 %, leicht vortexen;
- Mit N_2 überblasen und beschallen im Bandelin US-Bad: 315"-Sequenzen mit 30" Zwischenkühlung Eisblock;
- + 410 μl Tris/HCl 50 mM pH 7,5 100 mM MgCl_2 , vortexen;
- 82 μl UDP- ^{14}C GlcNAc 0,025 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ einblasen in Eppendorf-Cup;
- Eingeblassenes Zuckernukleotid mit Detergens-DolP-Lösung in Lösung bringen (in UDP-GlcNAc Cup überführen, vortexen);
- Je Reaktion 17,2 μl (0,05 μCi) einsetzen;
- Lagerung bei -20°C ;

A.2.10.5 Solubilisierung der GNT-Aktivität/ β 1,4-Mannosyltransferaseaktivität und GNT-Test

Solubilisierung Die Solubilisierung erfolgte bei $[\text{P}] = 6.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und $\text{NP40}/\text{Protein} = 3.83 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ nach folgendem Schema:

Für X μl Endvolumen zur Solubilisierung wurden

- $\left(\frac{6.5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \cdot X \mu\text{l}}{[\text{P}]_{\text{Membranen}}} \right)$ Membranfraktion in Membranaufnahmepuffer (A.2.1) mit
- Membranaufnahmepuffer auf $0.65 \cdot X \mu\text{l}$ gebracht,
- mit $0.2 \cdot X \mu\text{l}$ Puffer A (A.2.1) gemischt und mit
- $0.15 \cdot X \mu\text{l}$ 10 % NP40 (unter Vortexen zugesetzt) 20 Minuten auf Eis solubilisiert.
- Nach Ultrazentrifugation bei 200.000 g über 40 Minuten bei 4°C wurde das klare Solubilisat abgenommen und in den Reaktionen eingesetzt. Eine Lagerung bei -80°C ist ohne jeden meßbaren Aktivitätsverlust längerfristig möglich.

$[\text{NaCl}] = 30 \text{ mM}$; $[\text{Glycerin}] = 21.5 \%$;

GNT-Reaktionsprämix Je Reaktion zur Dünnschichtanalyse wurden 9000 cpm DolPP- $[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}_1$ eingesetzt. Prämix für 20 Reaktionen:

- 180.000 cpm LLO-Substrat im 1.5 ml Eppendorfgefäß einblasen;
- Mit 200 μl 0.25 % NP40 im Ultraschallbad lösen (vorher mit N_2 überblasen; 3 15"-Sequenzen mit Zwischenkühlung auf Eis);
- Mit 200 μl [50 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM MgCl_2] mischen;
- Mit 20 μl 6 mM UDP-GlcNAc_{kalt} versetzen;
- Je Reaktion 21 μl , Lagerung bei -20°C ;

Da für Hefe-GNT zuletzt ermittelt worden war, daß MgCl_2 -Konzentrationen über etwa 10 mM inhibierend wirken (vgl. Abb. II.7), empfiehlt es sich die MgCl_2 -Konzentration im Prämix künftig zu reduzieren.

Reaktion Die jeweils angegebenen Mengen an Solubilisat wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit Membranaufnahmepuffer auf ein Volumen von 39 μl gebracht und die Reaktion mit 21 μl Prämix gestartet. In der Regel wurde 10 Minuten bei 24°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2x 1 ml C/M 3:2 gestoppt, aufgearbeitet und analysiert wie unter A.2.11.2 beschrieben.

A.2.10.6 Synthese von DolPP $[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}_2\text{Man}_1$

Die Solubilisierung von Hefemembranen erfolgte wie unter A.2.10.5 beschrieben.
Reaktion (5x, in Reagensglas $\approx 1,5\text{ cm } \varnothing$):

- 62,5 μl [20 mM Tris/Cl pH 7,2 / 10 mM MgCl_2 / 1 mM DTT]
- + 18 μl Glycerin 87 %
- + 110 μl Solubilisat
- + 105 μl DolPP $[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}_2\text{-PM}^*$
- + 4,5 μl GDP-Man 100 mM (Reaktionsstart);

$\Sigma = 300\text{ } \mu\text{l}$; 90.000 cpm DolPP $[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}_2$; 1,5 mM GDP-Man; [Glycerin] $\approx 12,4\text{ } \%$;

Inkubation über 50 min bei 24°C H_2O -Bad;

Abstoppen und Aufarbeitung:

- Stopp mit 2x 2 ml C/M 3:2;
- Folch-Verteilung mit 500 μl 4 mM MgCl_2 (Vortex, 10 min 1.200 g);
- Oberphase (bis auf etwas Interphase) abnehmen und verwerfen;
- In gleicher Weise noch 2x mit je 1 ml UP 3:2:1 (A.2.1) nachverteilen;

- Die Masse der Unterphase mit einer 1 ml Gilson-Pipette, die restliche Unterphase zusammen mit der verbliebenen Interphase mit einer ausgezogenen Pasteurpipette (Protein bleibt zurück) in einem neuen Reagensglas sammeln, unter N₂ einblasen und in C/M 1:1 aufnehmen;
- Ein Aliquot (entsprechend etwa 3000 cpm) über Dünnschicht (A.2.11.2) auf Identität kontrollieren: Prinzipiell verläuft die Reaktion aber quantitativ und ohne Nebenprodukte.
- Bei -20°C in gut verschlossenem Sovirell-Glas lagern.

(*) DolPP[¹⁴C]GlcNAc₂-PM für 10 Reaktionen (18.000 cpm/21 µl):

- 180.000 cpm in Eppendorf-Reaktionsgefäß unter N₂ einblasen;
- + 100 µl NP40 0,25 %, mit N₂ überblasen, leicht vortexen, Ultraschallbad Bandelin: 3x 15 sec-Sequenzen mit Zwischenkühlung;
- + 100 µl [100 mM Tris/Cl pH 7,4 / 50 mM MgCl₂]
- + 10 µl H₂O

Σ = 210 µl; 23,81 mM MgCl₂; 0,12 % NP40;

A.2.10.7 Synthese von kaltem DolP-Man [nach C. B. Sharma]

Solubilisierung 50 mg Membranprotein in 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 3 mM MgCl₂, 35 % Glycerin, 0,04 % EtOHSH wurden unter Vortexen mit 300 µl 10 % Triton X-100 versetzt und mit dem gleichen Puffer auf ein Endvolumen von 5,5 ml gebracht. Bei unterbrechendem Vortexen wurde 20 Minuten auf Eis solubilisiert und anschließend bei 150.000 g und 4°C zentrifugiert. Das klare Solubilisat wurde abgenommen und in der Reaktion eingesetzt. Die Aktivität bleibt bei -80°C erhalten.

Präparative Reaktionen Je Reaktion wurden 25 µl DolP (2 mg/ml in C/M 2:1) eingeblasen, mit 100 µl Triton X-100 1 % gelöst, mit 300 µl Reaktionspuffer*, 25 µl H₂O und 25 µl GDP-Man 20 mM versetzt (0,714 mM GDP-Man i. Endvol.). Die Reaktion wurde gestartet mit 250 µl Solubilisat (Endvolumen 700 µl) und 12 Minuten bei 24 °C inkubiert. Mit der obigen Solubilisatpräparation sind 18 Inkubationen möglich.

Aufarbeitung

Stop mit je 6 ml C/M 3:2 und Vortexen. Proteinanteil durch Zentrifugieren bei 1200 g (5 min) pelletieren, Überstand in neues Glas überführen und Folch verteilen mit 600 µl H₂O (mischen, 5 min 1200 g). Obere Phase verwerfen, untere Phase zweimal mit 1,5 ml UP 3:2:1 A.2.1 waschen (ohne zu mischen, nur überschichten und jeweils Oberphase nach Zentrifugieren abnehmen), einmal mit 1,5 ml UP 3:2:1 vortexen und nach erneutem Zentrifugieren obere Phase verwerfen, untere Phase einblasen unter N₂ und in 500 µl C/M 3:2 aufnehmen.

GDP-[¹⁴C]Man Kontrollreaktion zur Stoffmengenabschätzung Reaktion und Aufarbeitung wie oben, aber mit 2 μCi GDP-[¹⁴C]Man und, abhängig von dessen spezifischer Radioaktivität, so viel kaltem GDP-Man, daß die Endkonzentration von 0.714 mM GDP-Man_{gesamt} wie im „kalten Ansatz“ erreicht wird. Das wie oben gewonnene DolP-Man des Gesamtansatzes wird gezählt und wie folgt, kann die Stoffmenge an Gesamt-DolP-Man abgeschätzt werden:

Bei etwa 90 % Zählausbeute würden ungefähr 19.98×10^5 cpm einem μCi entsprechen. So kann die Gesamtradioaktivität in μCi des gewonnenen DolP-[¹⁴C]Man-Anteils bestimmt werden. Teilt man dann durch die spezifische Radioaktivität der eingesetzten GDP-[¹⁴C]Man Charge, erhält man die Stoffmenge des gewonnenen radioaktiven DolP-Man Substrats. Multipliziert man diese dann mit $\frac{714 \mu\text{M} ([\text{GDP-Man}]_{\text{ges.}})}{\mu\text{M GDP-[}^{14}\text{C]Man}}$ erhält man die Gesamtmenge an Reaktionsprodukt eines Ansatzes.

(*) Reaktionspuffer: 50 mM Tris pH 7.4, 50 mM MgCl₂, 0.04 % EtOHSH;

A.2.11 Enzymatische Reaktionen humaner Fibroblasten

A.2.11.1 N-Oligosaccharyltransferasetest

Siehe Bedingungen unter A.2.10.2!

A.2.11.2 Bestimmung der gekoppelten Aktivität von GPT (Alg7p) und GNT in Mikrosomen

Reaktion (endogenes DolP):

- 145 μg Membranprotein
- + x μl Membranaufnahmepuffer_{Tris} (A.2.1)
- + 15 μl UDP-[¹⁴C]GlcNAc-Prämix* (Reaktionsstart);

$\Sigma = 60 \mu\text{l}$; 0,05 μCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc; 18,9 mM MgCl₂;

15 min Reaktion bei 24°C Wasserbad.

Stopp mit 2x 1 ml C/M 3:2;

Aufarbeitung:

- mit 340 μl 4 mM MgCl₂ verteilen (Vortex, $\geq 5'$ 1200 g);
- „upper phase“ abziehen, dünne Interphase bleibt zurück;
- 2x Waschen (Verteilen, up abziehen wie oben) mit je 500 μl UP 3:2:1 (A.2.1);
- „lower phase“ mit ausgezogener Pasteur-Pipette in Fiolaxglas abziehen und einblasen unter N₂;

Dünnschicht:

In 25 μl C/M 1:1 aufnehmen und auftragen auf Aluminium-Dünnschichtplatte Merck Kieselgel G60, die zuvor ca. 1 h bei 80°C erhitzt worden war, um stärkere Schwankungen im Feuchtigkeitsgehalt der Matrix zu vermeiden. Für 7 Spuren: 2x 2.2 cm Rand; 6 Zwischenräume a' 1.2 cm; 7

Spuren a' 1.2 cm. Für 8 Spuren (möglich, aber nicht optimal): 2x 2.2 cm Rand; 7 Zwischenräume a' 1.2 cm; 8 Spuren a' 0.9 cm Lauf in C/M/H 65:25:4 (ca. 2 - 2.5 h); Phosphorimager-Screen „Multipurpose“ oder „High Resolution“ auflegen (unterer Rand knapp unterhalb der Auftragslinie) und mindestens 36 h exponieren;

(*) UDP-[¹⁴C]GlcNAc-PM für 20 Reaktionen:

- 1 μCi UDP-[¹⁴C]GlcNAc in Eppendorf-Reaktionsgefäß einblasen;
- In 100 μl H₂O aufnehmen;
- + 200 μl [50 mM Tris/Cl pH 7,5 / 100 mM MgCl₂]

Σ = 300 μl ; 15 μl /Reaktion; Lagerung bei -20°C;

A.2.11.3 Verlängerung endogenen DolPs mit UDP-[¹⁴C]GlcNAc und in der Folge GDP-Man

145 μg Membranprotein in Membranaufnahmepuffer_{Tris} wurden in einem Endvolumen von 60 μl (entsprechend mit Membranaufnahmepuffer_{Tris} aufgefüllt) mit 15 μl „UDP-[¹⁴C]-GlcNAc-PM“ (0.05 μCi , siehe A.2.11.2) 15' bei 24°C umgesetzt (Glycerin-Konzentration ca. 26 %). Dann erfolgte ein Temperaturshift auf 32°C und anschließend die GDP-Man-Zugabe auf 0.5 mM Endkonzentration (3.16 μl 10 mM), worauf weitere 15 Minuten inkubiert wurde. Mit 1.8 ml C/M 2:1 wurde die Reaktion terminiert, verteilt mit 540 μl H₂O (Vortexen, 10 Minuten 1200 g Zentrifugation), die obere Phase vorsichtig abgenommen und verworfen, Interphase und „lower phase“ noch zwei mal mit 600 μl UP 3:2:1 (siehe A.2.1) verteilt und „lower phase“ wie Interphase/Protein getrennt aufgearbeitet.

„Lower phase“: Auftrennung auf Silica G60 in C/M/H 65:25:4 (A.2.11.2);

A.2.11.4 Bestimmung der GPT-Aktivität im Mikrosomensolubilisat

Je Test: 255 μg Membranprotein aus Fibroblasten via Pufferaufschluß; sinnvoll sind 2 Zeiten, 4' und 6'. Zudem sollte die DolPMan-Aktivierung getestet werden, am besten bei 4 Minuten Inkubation mit 8 μl DolPMan-Verdünnung (3.75 pmol/ μl , zuletzt 1:8) in C/M 3:2;

Solubilisierung für 3 Reaktionen (2 Zeiten, DolPMan-Aktivierung):

Endvolumen für Einzel-Solubilisierung: 42.5 μl ; [P] = 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; D/P = 1.0 nmol/ μg \equiv 6 mM DHPC i. Endvol.; [NaCl] i. Endvol.: 1.25 M; daher also konkret für 3 Reaktionen (mit geringem Überschuß - Faktor 3.2):

- Endvolumen für jede 3.2x - Solubilisierung: 136 μl ;
- Volumenbedarf für NaCl: 42.5 μl ;
- Volumenbedarf für DHPC: 14 μl ;
- 3.2 x 255 μg Membranprotein in Beckmann-Eppi = **816 μg** ;
- mit Membranaufnahmepuffer_{Tris} (pH 7.4) auffüllen auf 79.5 μl (= **Max. Vol. Membranen** - falls zu verdünnt, siehe unten!), vortexen;

- unter Vortexen NaCl zugeben: 42.5 μ l 4 M, **vorgekühlt**;
- Solubilisierung mit 13.6 μ l DHPC 60 mM Stammlösung in Puffer A (A.2.1); bei Verwendung einer konzentrierteren Lösung entsprechend auf 14 μ l (Volumenspielraum DHPC) mit Puffer A auffüllen - **vor** der Zugabe von DHPC!
DHPC unter Vortexen zugeben und 20' auf Eis solubilisieren, dazwischen immer wieder 30'' vortexen;
- 40' 62.000 rpm Beckmann UZ (150.000 g), 2°C;
- Solubilisat mit umgebogener Pipettenspitze in 500 μ l-Eppi abziehen, auf Eis;

Falls Membranen zu verdünnt, um maximales Endvol. einhalten zu können (10.3 μ g/ μ l Minmal-konz.):

Erforderliche Proteinmenge (X μ l) Membranen in Beckmann-Eppi 10' bei 49.000 rpm abzentrifugieren (2°C); X μ l - Max. Vol. Membranen (s. o.) = Pufferüberschuß; Pufferüberschuß abziehen; Pellet in Restpuffer resuspendieren: Endvolumen ist dann gleich Max. Vol. Membranen (79.5 μ l für 3.2x - Ansatz).

Zum Resuspendieren: Pipettenspitze umbiegen; Überstand so weit aufziehen, daß Pellet noch bedeckt ist; mit gefüllter Pipettenspitze durch auf- und nieder- Bewegung Pellet von Wand und Boden lösen; Pipettenspitze unter Entleeren und unter Abstreifen an Eppi-Wand so herausbewegen, daß nichts kleben bleibt; gut vortexen, erst mit niedriger, dann mit hoher Geschwindigkeit; Solubilisierung wie oben beschrieben durchführen; falls nach DHPC-Zugabe und Vortexen noch „Klumpchen“, durch Auf- und Abpipettieren mit gelber Spitze beseitigen - unter Vermeidung von Schaum!

Reaktion:

- Im Wassermann-Glas, bis zum Reaktionsstart auf Eis!
- Für DolP-Stimulierung: 8 μ l verdünntes DolPMan in C/M 3:2 (3.75 pmol/ μ l) einblasen im Wassermann-Glas;
- Für alle Reaktionen: 17.2 μ l UDP-GlcNAc/DolP-PM zugeben (PM = Prämix zur DolPP-GlcNAc₂-Synthese, A.2.10.4), am besten zuerst zum DolPMan-Ansatz; DolPMan-Ansatz anschließend mehrfach vortexen, um eingeblasenes DolPMan in Lösung zu bringen - Sichtkontrolle!
- + 6.5 μ l Membranaufnahmepuffer_{Tris}, Vortexen: insbesondere DolP-Man-Ansätze!;
- Reaktionsstart mit 36 μ l Solubilisat: Start der Uhr bei Zupipettieren, sofort 10'' vortexen (mäßiger Dauerbetrieb), Wasserbad 24°C;
- Abstoppen zu entspr. Zeit + 10'' (Vortexzeit beim Start):
+ 2x 1ml C/M 3:2;

Aufarbeitung und Dünnschichtanalyse wie unter A.2.11.2 beschrieben.

A.2.11.5 Bestimmung der GNT-Aktivität im Mikrosomensolubilisat

Je Test Solubilisat aus 145 μg Membranprotein aus Fibroblastenmembranen via Pufferaufschluß; sinnvoll sind 2 Zeiten, 6' und 8' bei 24 °C.

Solubilisierung für 2 Reaktionen (2 Zeiten) Endvolumen für Einzelsolubilisierung: 22.6 μl , $[\text{P}] = 6.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $\text{NP40}/\text{P} = 3.8 \text{ nmol}/\mu\text{g}$ ($\equiv 1.476 \%$); daher also konkret für 2 Reaktionen (mit geringem Überschuß - Faktor 2.3):

- Endvolumen für jede 2.3x-Solubilisierung: 51.98 μl ;
- Membranen für 2.3x-Ansatz (333.5 μg) in Beckmann-Eppi (Max. Vol. = 41.75 μl);
- mit Membranaufnahmepuffer_{Tris} auf Membranvolumen bringen (41.75 μl), vortexen;
- 10.23 μl 7.5 % NP40 unter Vortexen zugeben und 20' auf Eis solubilisieren, dazwischen immer wieder 30'' vortexen;
- 40' 62.000 rpm Beckmann UZ (150.000 g), 2°C;
- Solubilisat mit umgebogener Pipettenspitze in 500 μl -Eppi abziehen, auf Eis;

Prämix: 9000 cpm/Reaktion, 100 μM UDP-GlcNAc_{kalt}, 16.8 mM MgCl_2 in 60 μl Reaktionsvolumen; für 6 Reaktionen (entsprechend erweiterbar):

- 54.000 cpm DolPP-[¹⁴C]GlcNAc₁ in Eppendorf-Gefäß einblasen;
- + 60 μl 0.25 % NP40, mit N₂ überblasen, Ultraschallbad (Bandelin): ca. 3x 15'' mit 30'' Zwischenkühlung im Eisblock; vortexen;
- + 60 μl 50 mM Tris/HCl pH 7.5 100 mM MgCl_2 ;
- + 6 μl 6 mM UDP-GlcNAc kalt, vortexen;
- je Reaktion 21 μl Prämix;
- Lagerung -20 °C;

Reaktion

- 21.5 μl Membranaufnahmepuffer_{Tris} in Wassermann-Glas vorlegen;
- + 17.5 μl Solubilisat, leicht vortexen;
- Reaktionsstart mit 21 μl Prämix: Start der Uhr bei Zupipettieren, sofort 10'' vortexen (mäßiger Dauerbetrieb), Wasserbad 24°C;
- Abstoppen zu entspr. Zeit + 10'' (Vortexzeit beim Start):
+ 2x 1 ml C/M 3:2;

Die Aufarbeitung und Dünnschichtanalyse erfolgte wie unter A.2.11.2 beschrieben. Puffer sind unter A.2.1 beschrieben.

A.2.11.6 Bestimmung der DolP-Man-Synthaseaktivität in Rohmembranen humaner Fibroblasten

Ohne Zugabe von exogenem DolP: Je Reaktion wurden 160 μg Membranprotein (20 μl Volumen, gegebenenfalls mit Membranaufnahmepuffer_{Tris} A.2.1 aufzufüllen), 0.1 μCi GDP-[^{14}C]Man (0.1 $\mu\text{Ci}/10 \mu\text{l}$), 50 mM Tris-HCl pH 7.5 sowie 21 mM MgCl_2 (24 μl 100 mM Tris pH 7.4, 50 mM MgCl_2) in einem Endvolumen von 60 μl (mit H_2O auffüllen) im Fiolaxglas umgesetzt. Die Glycerin-Konzentration (aus 20 μl Membranvolumen) beträgt dabei etwa 11 %. Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von GDP-Man gestartet und 2 Minuten bei 24°C inkubiert, abgestoppt mit 2 ml C/M 3:2, verteilt mit 340 μl 4 mM MgCl_2 und noch 2 mal gewaschen mit je 0.5 ml UP 3:2:1 (A.2.1). Dabei wurde jeweils die Oberphase quantitativ abgenommen und verworfen, die Unterphase entweder direkt (nach Trocknung) über Szintillationszählung analysiert oder aber auf Dünnschicht aufgetragen und quantifiziert entweder über ein Proportionalzählrohr oder über Phospho-Imaging (vgl. A.2.11.2).

Unter Zugabe von exogenem DolP: Prinzipiell analog zur Reaktion ohne exogenem DolP; allerdings unter Verwendung von nur 82 μg Membranprotein (20 μl Volumen, gegebenenfalls mit Membranaufnahmepuffer_{Tris} aufzufüllen), 17.2 μl DolP-Prämix* und aufgrund des darin enthaltenen MgCl_2 nur 4 μl 100 mM Tris/50 mM MgCl_2 -Puffer. Inkubation, Aufarbeitung und Analyse wie im Falle ohne exogenem DolP.

(*) DolP-Prämix für 10 Reaktionen:

- 18 μl 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DolP (in C/M 1:1) einblasen (Eppendorfgefäß);
- Aufnehmen in 72 μl 1 % NP40 (Vortexen, US-Bad unter N_2 mit Zwischenkühlung);
- Mischen mit 100 μl [50 mM Tris pH 7.5; 100 mM MgCl_2]
- Mit N_2 überblasen bei 4°C lagern;
- Je Reaktion 17.2 μl Prämix (0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DolP sowie 0.12 % NP40 im Reaktionsendvolumen);

A.2.11.7 Bestimmung der Mannosyltransferaseaktivitäten bis LLOM₅ im Mikrosomenso-lubilisat

Je Reaktion (bei 37°C) kam Solubilisat aus etwa 56 μg Membranprotein zum Einsatz.

Solubilisierung (NP40/P = 2.32 nmol/ μg sowie [P] = 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$):

- Pelletieren von 297.5 μg Membranprotein (in Membranaufnahmepuffer_{Tris} siehe A.2.3) (Beckmann 1.5 ml Reaktionsgefäß) in Beckmann-UZ 80.000 g bei 2°C, 10 min.
- Resuspendieren in 30.8 μl Reaktionspuffer*;
- Zugabe von 5.55 μl NP40 7.5 % unter Vortexen und Volumenkontrolle/Resuspendieren von letzten Membranklumpen: Falls < 42.5 μl , entsprechendes Auffüllen mit Reaktionspuffer*. 20 Minuten Solubilisieren auf Eis, Vortexen etwa alle 5 Minuten.
- Zentrifugation für 40 min bei 60.000 rpm (150.000 g) und 2°C;

- Abnehmen des klaren Solubilisats ($\geq 35 \mu\text{l}$), das bei -80°C ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden kann.

Reaktion (60 μl Endvol., 0.13 % NP40, 10 mM MgCl_2 , 0.9 mM DTT, 0.14 mM Na-EDTA, 19 mM Tris-HCl pH 7.1, 1 mM GDP-Man und 3.000 cpm [^{14}C]-GlcNAc₂PPDol bzw. Man₁[^{14}C]-GlcNAc₂PPDol oder ca. 7.000 cpm [^3H]Man₂GlcNAc₂PPDol):

- 38 μl Reaktionspuffer*;
- 7 μl Enzymsolubilisat;
- 12 μl LLO-Prämix**;
- Start mit 3 μl 20 mM GDP-Man;

(*) Reaktionspuffer: 20 mM Tris pH 7.1, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT;

(**) LLO-Prämix für 10 Reaktionen ($[\text{MgCl}_2] = 11.3 \text{ mM}$, $[\text{NP40}] = 0.0744 \%$):

- Einblasen der erforderlichen Menge LLO-Substrats (Eppendorf-Reaktionsgefäß);
- Im Ultraschallbad (Bandelin) mit 35,7 μl NP40 0.25 % dispergieren: 3x 10 sec., Zwischenkühlung;
- Versetzen mit 84.3 μl 30 mM Citrat/ K_2HPO_4 -Puffer pH 6.9 (16.1 mM MgCl_2 , 1 mM Na-EDTA, 1 mM DTT);
- Lagerung bei -20°C ;

Stopp der Reaktion und Aufarbeitung wie unter A.2.11.9 beschrieben.

A.2.11.8 Präparative LLOM₅-Synthese aus DolPP[^{14}C]GlcNAc₂ und GDP-Man

Solubilisiert wurde nach Standardbedingungen A.2.11.7. Die Reaktion, deren Details im folgenden beschrieben sind, lief 35 Minuten bei 37°C .

1. Chitobioseprämix analog LLOM₁-Prämix, nur 4000 cpm/12 μl ;
2. Präparativer (theoretischer) Einfach-Ansatz eines Endvolumens von 60 μl bestehend aus 14 μl Solubilisat, 24 μl Prämix (8000 cpm), 3 μl 20 mM GDP-Man und 19 μl Tris-Puffer 20 mM pH 7.1, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT;
3. Umgesetzt wurde ein 5x Ansatz, also 300 μl Endvolumen, abgestoppt mit 3.45 ml C/M 2:1, mit 850 μl H_2O verteilt, 800 μl „upper phase“ abgezogen und noch 2x mit je 850 μl UP 2:1:1 (A.2.1) gewaschen, wobei je das gleiche Volumen an „upper phase“ abgenommen wurde. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Standardmethoden (vgl. A.2.11.9).

Sehr wahrscheinlich ließe sich noch um einiges mehr als die hier eingesetzten 4000 cpm Edukt/7 μl Solubilisat umsetzen, da auch nicht die Spur eines Rests von DolPPGlcNAc₂ auf Dünnschicht nachweisbar war.

A.2.11.9 Bestimmung der Mannosyltransferaseaktivitäten von LLOM₆ bis LLOM₉ in Mikrosomenmembranen

Für die Verlängerung von LLO[³H]M₆ bzw. LLO[³H]M₇ (jeweils gewonnen aus [³H]Man-Markierungen entsprechender Hefemutanten, A.2.7) in Fibroblastenmembranen wurden jeweils etwa 40.000 cpm Substrat (in C/M/H 10:10:3) zusammen mit etwa 70 pmol kaltem DolPMan (in C/M 1:1) unter N₂ im Wassermannnglas eingeblasen, 10 µl Citrat/Phosphatpuffer pH 6.5 (30 mM, 1 mM DTT, 35 % Glycerin) zugegeben und mit 2.33 µl NP40 7.5 % durch kräftiges Vortexen resuspendiert, 5.3 µl 15 mM Phosphatidylcholin (in Membranaufnahmepuffer_{Tris} dispergiert) sowie 7.5 µl 100 mM MnCl₂ hinzugefügt und wieder gut gevortext. Um zusammen mit dem erforderlichen Volumen an Membranen (150 µg Protein) auf ein Reaktionsendvolumen von 70 µl zu kommen, wurde zunächst die Membranzugabedifferenz zwischen den einzelnen Ansätzen (bedingt durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen) durch Zugabe einer entsprechenden Menge Membranaufnahmepuffer_{Tris} ausgeglichen, das noch fehlende Restvolumen durch Wasser ergänzt und erneut gevortext.

Reaktionsstart erfolgte durch Membranzugabe. Bei 24°C im Wasserbad wurde 20 Minuten inkubiert und mit je 1.8 ml C/M 2:1 abgestoppt.

Aufarbeitung: Mit je 530 µl H₂O wurde eine Folch-Verteilung (C/M/H 2:1:1) durchgeführt: Nach Vortexen und 10 Minuten Zentrifugation bei 1.200 g wurden 600 µl der „upper phase“ abgenommen und noch zwei mal mit je 600 µl UP 2:1:1 (A.2.1) gewaschen (jeweils wieder 600 µl „upper phase“ entfernt). Die verbliebene Interphase und „lower phase“ wurden unter N₂ bei 37°C eingeblasen.

Die gebildeten lipidgebundenen Oligosaccharide wurden wie folgt extrahiert:

1 ml C/M/H 10:10:3 an der Glaswand entlang ins Wassermannnglas laufen lassen, Verschuß mit etwas Alufolie und Parafilm und Beschallung für ca. 1 Minute im Branson Ultraschallbad. Kurz Vortexen und 10 Minuten Zentrifugation 1.200 g zur Pelletierung des Proteinanteils. Abziehen des klaren Überstands in ein 1.5 ml Schraubdeckel-Eppendorf-Reaktionsgefäß und Einblasen unter N₂ bei 37°C. Der im Wassermannnglas verbliebene Proteinanteil wurde einer zweiten 10:10:3-Extraktion unterzogen, im Wesentlichen wie oben, allerdings mit nur 500 µl Lösungsmittel im offenen Wassermannnglas und ohne Beschallung. Der nach erneuter Zentrifugation erhaltene Überstand wurde vereinigt mit dem der ersten Extraktion und erneut unter N₂ bis zur Trockne eingeblasen.

Mildsaure Hydrolyse: Zugabe von 120 µl 0.02 N HCl und Hydrolyse im Schraubdeckel-Eppendorfgefäß bei 100°C 30 Minuten. Kurz neutralisieren mit NH₃-Dampf, einblasen unter N₂ bei 40°C und Phasenverteilung mit 200 µl H₂O sowie 600 µl C/M 2:1 (5 Minuten Eppendorf-Zentrifuge). Untere Phase abpipettieren und obere Phase über 0.45 µm Durapore Membran (Amicon) filtrieren (4000 g Eppendorfszentrifuge). Filtrat unter N₂ einblasen, aufnehmen in 30 µl Millipore-H₂O, erneut neutralisieren mit ca. 70 µl NH₃-Dampf und HPLC-Analyse (siehe A.3.1).

A.3 Analytische Methoden

A.3.1 HPLC von Oligosacchariden

Die Auftrennung der nach mildsaurer Hydrolyse erhaltenen freien Oligosaccharide erfolgte über Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie an einer „Supelco Sil LC-NH₂“-Säule (25 cm x 4.6 mm

Ø) mit linearem Gradienten in einem Acetonitril/H₂O-System. Folgende Gradienten kamen zur Anwendung:

1. Zur Auftrennung längerkettiger LLOs: Ausgehend von 70:30 (v/v) CH₃CN:H₂O bis 50:50 (v/v) CH₃CN:H₂O innerhalb von 75 Minuten;
2. Zur Auftrennung ab GlcNAc₂ bis GlcNAc₂Man₉Glc₃: Ausgehend von 80:20 (v/v) CH₃CN:H₂O bis 50:50 (v/v) CH₃CN:H₂O innerhalb von 75 Minuten;
3. Zur Auftrennung ab GlcNAc₂ bis GlcNAc₂Man₅: Ausgehend von 80:20 (v/v) CH₃CN:H₂O bis 60:40 (v/v) CH₃CN:H₂O innerhalb von 50 Minuten.

Die Oligosaccharidfraktionen ([³H]Man bzw. [¹⁴C]GlcNAc-markiert) wurden mit einem Durchflußszintillationszähler quantifiziert. Die Zuordnung einzelner „Peaks“ zu bestimmten Oligosacchariden erfolgte durch einen Vergleich mit der Retentionszeit definierter Referenzverbindungen.

A.4 Molekularbiologische Methoden

A.4.1 Transformation von *E. coli*, Elektroporation

E. coli-Zellen wurden durch Elektroporation mit dem Gene Pulser der Firma Bio Rad (München) nach Herstellerangaben (25 µF, 2.5 kV, 200 Ω) transformiert. Pro Transformationsansatz wurden ca. 10⁹ Zellen und 40 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Positive Transformanten wurden durch Ampicillinresistenz selektioniert.

A.4.2 Transformation von Hefen, Elektroporation

Apparatur: wie oben!

Zellpräparation:

- Anzucht der Zellen in YEPD (250 ml) auf OD₅₇₈ von 1-1.5.
- Ernte der Zellen (pro Trafo 40 OD₅₇₈).
- Waschen in kaltem, 1 M Sorbit.
- Resuspendieren in 1 µl kaltem, 1 M Sorbit je OD₅₇₈ Zellen (40 µl für 40 OD).

Elektroporation:

- Je Transformation Durchmischen von 40 µl Zellsuspension und etwa 200 ng Plasmid-DNA (Maximalvolumen 5 µl); Inkubation auf Eis, 5 min.
- Elektroporation bei 1.25 kV, 25 µF und 200 Ω.
- Unmittelbar nach Puls, Zugabe von 750 µl kaltem, 1 M Sorbit.
- Ausplattieren von je 250 µl auf drei Agarplatten (selektiv) pro Trafo.
- Inkubation bei 29°C.

A.4.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für Restriktionsanalysen oder Klonierungen wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* nach der Methode von Ish-Horowicz und Burke (1981) [41] durch alkalische Lyse der Zellen isoliert. Vor der Ethanol-fällung wurde die DNA noch mit 1 Volumen Chloropan (s.u.) und 1 Volumen CIA (Chloroform : Isoamylalkohol = 24:1 v/v) extrahiert.

Chloropan: Phenol : Chloroform 1:1 (w/w),
 0.05 % p-Hydroxychinolin (w/v),
 Über Nacht mit 150 ml ANE-Puffer äquilibrieren.

ANE-Puffer: 10 mM NaAc,
 100 mM NaCl,
 1 mM EDTA.

A.4.4 Vektorkonstrukt für die *S. cerevisiae alg2-1*-Transformation mit **hALG2** bzw. **Δ1040G hALG2**

Die hALG2-cDNAs einer Kontrolle bzw. des mütterlichen Allels des Patienten M.S. wurden zunächst in den pBS-SK Vektor (Stratagene) kloniert, als *EcoRI* 1260 bp Fragmente isoliert und, unter Kontrolle des *PMA1*-Promotors, in die *EcoRI* Schnittstelle des Hefe-Shuttlevektors pNEV-E [102] ligiert. Die Konstrukte, pNEV-ManTwt und pNEV-ManTpat, wurden, wie auch der leere Vektor, in den Hefestamm *alg2-1* (MAT α *ura3-52*) transformiert (nach Standardtechniken [29]). Hefezellen wurden kultiviert in YNBD Medium (0.67% yeast nitrogen dropout *ura*, 2% Glucose).

Anhang B

Materialien

B.1 Chemikalien und Enzyme

Alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel waren analysenrein und wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Verbrauchsmaterial stammte von den Firmen Greiner und VWR international. Soweit nicht bereits im Methodenteil aufgeführt, werden hier weitere Quellen genannt.

Folgende Firmen lieferten:

Amersham Life Science: Alle radioaktiven Zuckernukleotide

J. T. Baker (Deventer): Acetonitril für HPLC

Calbiochem: Nonidet P40, HEPES-Puffer, 1-Deoxynorjirimycinhydrochlorid als Glucosidase-Inhibitor

Difco (Detroit, USA): Hefe-Medien, wie im Methodenteil aufgeführt

Gibco: Pferdeserum, alle Zellkulturmedien (Methodenteil)

Millipore: Amicon Ultrafree-MC 0.45 μm Durapore-Membran Filter Units zur Proben-Filtration vor der HPLC-Analyse, HV-Filter (Porengröße 0.45 μm , Ø 47 mm) zur Filtration von HPLC-Laufmitteln, Millex[®]-GS 0.22 μm Filter Unit mit Luer Lock-Anschluß 4 mm zur Sterilfiltration von Zellkulturmedien

Nikko Chemicals (Japan): Nikkol BL-8SY (Polyoxyethylene mono 8-dodecylether)

Nunc: Kryotubes, 1 ml

Pierce: Triton X-100 (hochrein)

Roche: PMSF, Benzamidin

Roth (Karlsruhe): Rotiszint® ecoplus, Acrylamide-/N,N'-Methylenbisacrylamidlösung (30/0.8 % w/v) für Proteingele

Sarstedt: Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen

Sigma (Deisenhofen): Diheptanoylphosphatidylcholin, PIPES-Puffer, MOPS-Puffer, Dolichol-Monophosphat (C₈₀₋₁₀₅, Reinheitsgrad III aus Leber), L- α -Phosphatidylcholin (Typ XVI-E aus gefrorenem Hühnereigelb), UDP-GlcNAc, GDP-Man, GDP, UDP, UMP, Tween 20, Ponceau S, Anti-rabbit-IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase

USB (Cleveland, USA): Tris-Puffer

B.2 Spezielle Geräte

Bandelin „Sonorex RK 52“ Ultraschallbad zur Dispersion von Oligosaccharidlipiden in Kunststoff-Reaktionsgefäßen ≤ 2 ml

Branson „Bransonic 220“ Ultraschallbad zur Dispersion von Oligosaccharidlipiden in Reagenzgläsern oder Wassermanngläsern

Branson „Sonifier 450“ mit durchflußgekühltem Beschallungsbecher zur Dispersion von DHPC zur Bereitung einer 200 mM Stammlösung

Beckmann Ultrazentrifuge „OptimaTM TL“ für alle Solubilisierungen

Eppendorf Biophotometer zur Bestimmung der Kulturdichte über OD₆₀₀, der DNA-Konzentration sowie der Proteinkonzentration (Bradford-Methode)

B.3 Organismen und Plasmide

Tabelle B.1: Plasmide und Vektoren

Name	Größe, Marker	Referenz
YEp352	5.2 kb, ori, bla, 2 μ , <i>URA3</i>	[36]
YEp-OST3	6.8 kb genom. Fragment mit <i>OST3</i> ORF in YEp352	dieses Labor
pOST6	4 kb genom. Fragment mit <i>OST6</i> ORF in YEp352	dieses Labor

Tabelle B.2: Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Referenz
W303 a/ α	<i>MATa/MATα leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 ura3-1/ura3-1 ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 can1-100/can1-100</i>	[98]
X2180-1A	<i>MATa SUC2 mal mel gal2 CUP1</i>	Genetic Stock Center, Berkley
SS328	<i>MATαade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801</i>	[120]
SS330	<i>MATa ade2-101 ura3-52 his3Δ200 tyr1</i>	[120]
YG191 (Δ ost3)	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 Δost3::HIS3</i>	dieses Labor
SKY325 (Δ ost6)	<i>MATa ade2-101 ura3-52 his3Δ200 tyr1 ura3 Δost6::URA3</i>	dieses Labor
RKY327 (Δ ost3 Δ ost6)	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 Δost3::HIS3 Δost6</i>	dieses Labor
RKY346 (Δ ost3 + pOST6)	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 Δost3::HIS3 YEP352-OST6</i>	dieses Labor
SKY325 + pOST6 (Δ ost6 + pOST6)	<i>MATa ade2-101 ura3-52 his3Δ200 tyr1 ura3 Δost6::URA3 YEp352-OST6</i>	diese Arbeit
YG191 + pOST3 (Δ ost3 + pOST3)	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 Δost3::HIS3 YEp352-OST3</i>	diese Arbeit
RKY348 (Δ ost3 Δ ost6 + pOST6)	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 Δost3::HIS3 Δost6 YEP352-OST6</i>	dieses Labor
RKY327 + pOST3 (Δ ost3 Δ ost6 + pOST3)	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 Δost3::HIS3 Δost6 YEp352-OST3</i>	diese Arbeit
YG 247 (Δ alg3)	<i>MATα Δalg3::HIS3 ade2 his3 ura3 tyr1</i>	dieses Labor
FPIN101-19A(A) (Δ alg9)	<i>FY MATa ura3-52 HIS3 LEU2 LYS2 trp1Δ63 YNL219c(70,1627)::kanMX4</i>	Euroscarf
FHEN005-02C(A) (Δ alg12)	<i>FY MATa ura3-52 HIS3 LEU2 LYS2 trp1Δ63 YNR030w(230,1656)::kanMX-loxP</i>	Euroscarf
<i>gpi1-8A</i>	<i>gpi1 MATα ade2-101 ura3-52 his4</i>	[80–82]

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über die ER-lokalisierten Schritte der N-Glykosylierung	4
2	Schema des Vollängenoligosaccharidlipids	7
3	Übersicht über den Oligosaccharyltransferase-Komplex aus <i>S. cerevisiae</i>	11
4	Topologie der Untereinheiten des Oligosaccharyltransferase-Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	12
I.1	Wachstumstest in Abhängigkeit von Temperatur und Coffein	22
I.2	Auswirkungen der Überexpression bzw. Deletion von <i>OST6</i> auf Ost3p	26
I.3	Auswirkungen der Überexpression bzw. Deletion von <i>OST3</i> auf Ost6p	26
I.4	Blue native PAGE und Western-Analyse von WT, $\Delta ost3$, $\Delta ost6$ sowie $\Delta ost3 \Delta ost6$	28
I.5	Blue native PAGE und Western Blot: $ost3\Delta$ und $ost3\Delta$ + p <i>OST3</i>	30
I.6	Blue native PAGE und Western Blot: $ost3\Delta$ und $ost3\Delta ost6\Delta$ + p <i>OST6</i>	30
I.7	Stabilität des OST-Extraktes aus NP40/NaCl-Solubilisierung	35
II.1	Kinetik DolPP-GlcNAc ₂ -Bildung: NP40/Protein 0.26 und 0.44 nmol/ μ g	38
II.2	Optimierung des NP40/P-Verhältnisses zur DolPP-GlcNAc ₂ -Synthese	40
II.3	UDP-Hemmung der zweiten GlcNAc-Transferase	42
II.4	Präparative DolPP-GlcNAc ₁ -Produktion	46
II.5	Proteinabhängigkeit der GNT	48
II.6	Stabilität der solubilisierten GlcNAc-Transferaseaktivität	49
II.7	Inhibierung der GlcNAc-Transferase durch hohe Mg ²⁺ -Konzentrationen	50
II.8	Optimierung der LLO-Man ₁ -Gewinnung aus Hefe-DHPC/NaCl-Solubilisat	51
II.9	LLOM ₁ -Produktcharakterisierung über β 1,4-Mannosidase Verdau	52
III.1	Kinetik der solubilisierten GPT aus humanen Fibroblastenmembranen	61
III.2	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit solubilisierter GPT aus humanen Fibroblastenmembranen von der Konzentration an DolP-Man	62
III.3	Zeitabhängigkeit der humanen GNT-Reaktion bei Einsatz solubilisierten Enzyms	64
III.4	„GDP-Man-Chase“ in Fibroblastenmembranen, Kontrolle und Patient	66
III.5	Versuche zur Solubilisierung von Mannosyltransferaseaktivitäten aus humanen Fibroblastenmembranen	68
III.6	Kontroll-Kinetik DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ -Verlängerung mit GDP-Man	69
III.7	Kontroll-Kinetik 2 und Kurzzeitkinetik DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ -Verlängerung mit GDP-Man	71
III.8	Kinetik der GDP-Man-Verlängerung: Kontrolle versus Patient	73
III.9	α 1,3-Mannosyltransferase: Hemmversuch mit GDP	75
III.10	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₂ : Identitätsabklärung über analytischen Verdau	77

III.11 Verlängerung von DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ in Fibroblastensolubilisat aus Kontrolle und Patient - HPLC-Profil	79
III.12 Komplementation der <i>alg2-1</i> Hefemutante mit Patientengen und humanem Kontrollgen - C/M-LLO-Extrakt	80
III.13 Komplementation der <i>alg2-1</i> Hefemutante mit Patientengen und humanem Kontrollgen	81
III.14 Hefe <i>alg2-1</i> -Defekt (Robbins <i>et al.</i>): Welche Transferaseaktivität codiert <i>ALG2</i> ? . .	82
III.15 <i>In vitro</i> -Verlängerung von DolPP-GlcNAc ₂ Man ₂ in Kontroll- und Patientensolubilisat	84
III.16 <i>In vitro</i> -Verlängerung von DolPP-GlcNAc ₂ Man _{6/7} mit DolPMan in Membranen aus Kontroll- und Patientenfibroblasten	86
IV.1 GPT/GNT-Aktivität in Fibroblastenmembranen in Abhängigkeit von der Kulturdauer bzw. des letzten Medienwechsels	91
IV.2 OST-Aktivität in Fibroblastenmembranen: Kinetik	93
IV.3 OST-Aktivität in Fibroblastenmembranen: Bestimmung des apparenten K_M -Wertes für das Hexapeptidsubstrat	94
IV.4 Variation der OST-Aktivität in Fibroblastenmembranen unterschiedlicher Kontrollen und Patienten	95
IV.5 Oligosaccharyltransferasetest von präsumptiven <i>rpn2</i> -Fibroblasten und Kontrollen: DolPP-GlcNAc ₂ Man ₁ und 14er Peptid, 5 und 7 Minuten	97
IV.6 Oligosaccharyltransferasetest von präsumptiven <i>rpn2</i> -Fibroblasten und Kontrollen: LLO[³ H]Man ₉ Glc ₃ und 14er Peptid	99
IV.7 Patient „DE“: GPT-Aktivitätstest sowie Test auf Stimulierbarkeit mit DolP-Man im Vergleich zur Kontrolle 167	100
IV.8 Patient „DE“: GNT-Aktivitätstest	101
IV.9 Patient „DE“: DolP-Man-Synthaseaktivitätstest im Vergleich zur Kontrolle 167 mit und ohne exogenem DolP	102
IV.10 Patient „DE“: Mannosyltransferasetest aller 5 cytosolisch aktiven Transferasen . .	103
IV.11 Patient „DE“: Aktivitätstest aller 4 cytosolisch aktiven α -Mannosyltransferasen . .	105

Tabellenverzeichnis

I.1	Western Blots Anti-Ost3p/Anti-Ost6p: Quantifizierung	27
I.2	Solubilisierungseffizienz in Abhängigkeit vom DHPC zu Protein-Verhältnis sowie der Salz-Konzentration: OST	33
II.1	Solubilisierungseffizienz in Abhängigkeit vom DHPC zu Protein-Verhältnis sowie der Salz-Konzentration: GPT _{<i>S.cerevisiae</i>}	45
II.2	NP40-Solubilisierung versus DHPC/NaCl von Hefemembranen	55
III.1	Solubilisierungseffizienz in Abhängigkeit vom DHPC zu Protein-Verhältnis sowie der Salz-Konzentration: GPT _{<i>hum</i>}	60
IV.1	OST-Aktivität von Fibroblastenmembranen in Abhängigkeit von der Kulturdauer bzw. des letzten Medienwechsels	92
B.1	Plasmide und Vektoren	140
B.2	Hefestämme (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	141

Literaturverzeichnis

- [1] Abeijon, C. and Hirschberg, B. (1990). Topography of Initiation of *N*-Glycosylation Reactions. *J. Biol. Chem.* Vol. 265, No. 24, 14691-14695
- [2] Anand, M. *et al.* (2001). Requirement of the *lec35* gene for all known classes of monosaccharide-p-dolichol-dependent glycosyltransferase reactions in mammals. *Mol. Biol. Cell* 12, 487-501
- [3] Baenzinger, J. U. (1994). Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it! Review. *The FASEB J.* Vol. 8, 1019-1025
- [4] Bause, E. (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* 209, 331-336
- [5] Belard, M., Cacan, R. and Verbert, A. (1988). Characterization of an oligosaccharide-pyrophosphodolichol pyrophosphatase activity in yeast. *Biochem. J.* 255, 235-242
- [6] Bennet, V. and Branton, D. (1977). Selective association of spectrin with the cytoplasmic surface of human erythrocyte plasma membranes. Quantitative determination with purified [³²P]spectrin. *J. Biol. Chem.* Vol. 252, No. 8, 2753-2763
- [7] Brown, K. C. *et al.* (1998). Determining Protein-Protein Interactions by Oxidative Cross-Linking of a Glycine-Glycine-Histidine Fusion Protein. *Biochemistry* 37, 4397-4406
- [8] Burda, P. and Aepli, M. (1998). The dolichol pathway of *N*-linked glycosylation. Review. *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 239-257
- [9] Burgoyne, R. D. *et al.* (1989). Distribution of two distinct Ca²⁺-ATPase-like proteins and their relationships to the agonist-sensitive calcium store in adrenal chromaffin cells. *Nature* 342, 72-74
- [10] Chapman, A., Li, E. and Kornfeld, S. (1979). The Biosynthesis of the Major Lipid-linked Oligosaccharide of Chinese Hamster Ovary Cells Occurs by the Ordered Addition of Mannose Residues. *J. Biol. Chem.* Vol. 254, No. 20, 10243-10249
- [11] Cipollo, F. J. and Trimble, R. B. (2000). The Accumulation of Man₆GlcNAc₂-PP-dolichol in the *Saccharomyces cerevisiae* Δ *alg9* Mutant Reveals a Regulatory Role for the Alg3p α 1,3-Man Middle-arm Addition in Downstream Oligosaccharide-lipid and Glycoprotein Glycan Processing. *J. Biol. Chem.* Vol. 275, No. 6, 4267-4277

- [12] Cipollo, J. F., Trimble, R. B., Chi, J. H. Yan, Q. and Dean, N. (2001). The Yeast *ALG11* Gene Specifies Addition of the Terminal α 1,2-Man to the $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{PP-dolichol}$ *N*-Glycosylation Intermediate Formed on the Cytosolic Side of the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, No. 24, 21828-21840
- [13] Cipollo, J. F. and Trimble, R. B. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae alg12 Δ* mutant reveals a role for the middle-arm α 1,2Man- and upper-arm α 1,2Man α 1,6Man- residues of $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ in regulating glycoprotein glycan processing in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Glycobiology* Vol. 12, No. 11, 749-762
- [14] Dan, N., Middleton, R. B. and Lehrman, M. A. (1996). Hamster UDP-*N*-Acetylglucosamine:Dolichol-P *N*-Acetylglucosamine-1-P Transferase Has Multiple Transmembrane Spans and a Critical Cytosolic Loop. *J. Biol. Chem.* Vol. 271, No. 29, 30717-30724
- [15] Dan, N. and Lehrman, M. A. (1997). Oligomerization of Hamster UDP-GlcNAc:Dolichol-P GlcNAc-1-P Transferase, an Enzyme with Multiple Transmembrane Spans. *J. Biol. Chem.* Vol. 272, No. 22, 14214-14219
- [16] De Groot, P. W. *et al.* (2001). A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp. Funct. Genomics* 2, 124-142.
- [17] De Konig, T. J. *et al.* (1998a). Phosphomannose isomerase deficiency with cyclic vomiting and congenital hepatic fibrosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 21, 96
- [18] De Konig, T. J. *et al.* (1998b). A novel disorder of N-glycosylation due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 38-42
- [19] De Nobel, J. G. *et al.* (1990). The Glucanase-Soluble Mannoproteins Limit Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6: 491-499
- [20] Dennis, J. W., Granovsky, M. and Warren, C. E. (1999). Protein glycosylation in development and disease. Review. *BioEssays* 21, 412-421
- [21] Dennis, J. W. *et al.* (2001). Genetic defects in *N*-glycosylation and cellular diversity in mammals. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 601-607
- [22] Elorza, M. V., Rico, H., Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *S. cerevisiae* and *C. albicans*. *J Gen Microbiol* 129: 1577-1582
- [23] Fancy, D. A. and Kodadek, T. (1998). A Critical Role for Tyrosine Residues in His₆-Mediated Protein Cross-Linking. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 247, 420-426
- [24] Flitsch, S. and Davies, J. (2003). The glycosyltransferases involved in the early stages of N-glycan Biosynthesis. Eurotron Net-Conferences EGC-5: „Synthesis of Biologically Important Carbohydrates and Analogues“ 02.06.-06.06.03 at www.netconferences.net/eurotron/vwk/vwklibrary
- [25] Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* Vol. 226, 497-509

- [26] Freeze, H. H. (2001). Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiol.* Vol. 11 No. 12, 129R-143R
- [27] Freeze, H. H. (2002). Human disorders in *N*-glycosylation and animal models. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 388-393
- [28] Gavel, Y. and von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* Vol. 3 No. 5, 433-442
- [29] Gietz, R. D. and Schiestl, R. H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as carrier. *Yeast*, 7, 253-263
- [30] Hauser, H. (2000). Short-chain phospholipids as detergents. Review; *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 164-181
- [31] Heinisch, J. J. *et al.* (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. Review. *Molec. Microbiol.* 32(4), 671-680
- [32] Helenius, J. *et al.* (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* Vol. 415, 447-450
- [33] Helenius, J. and Aebi, M. (2002). Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during *N*-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Seminars in Cell & Developm. Biol.* Vol. 13, 171-178
- [34] Helenius, A. and Aebi, M. (2001). Intracellular Functions of N-Linked Glycans. Review. *Science* Vol. 291, 2364-2369
- [35] Herscovics, A. and Orlean, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *The FASEB J.* Vol. 7, 540-550
- [36] Hill, J. E. *et al.* (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163-167
- [37] Huffaker, T. C. and Robbins, P. W. (1982). Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* 257, 3203-3210
- [38] Huffaker, T. C. and Robbins, P. W. (1983). Yeast mutants deficient in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7466-7470
- [39] Imbach, T. *et al.* (2000). Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-I causes congenital disorder of glycosylation type Ie. *J. Clin. Invest.* 105, 233-239
- [40] Ioffe, E. and Stanley, P. (1994). Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, 728-732
- [41] Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acids Res.* 9, 2989-2998

- [42] Jackson, B. J., Kukuruzinska, M. A. and Robbins, P. (1993). Biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: the *alg2* mutation. *Glycobiology* Vol. 3 No. 4, 357-364
- [43] Jacoby, J. J. *et al.* (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol Gen Genet* 258, 148-155
- [44] Jaeken, J. *et al.* (1980). Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatric Res.* 14, 179
- [45] Jaeken, J. *et al.* (1998). Phosphomannose isomerase deficiency: a carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with hepatic-intestinal presentation. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1535-1539
- [46] Jaeken, J. and Carchon, H. (2001). Congenital disorders of glycosylation: the rapidly growing tip of the iceberg. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 811-815
- [47] Jensen, J. W., Springfield, J. D. and Schutzbach J. S. (1980). The Biosynthesis of Oligosaccharide-Lipids: Isolation of an Oligosaccharide-P-P-Lipid Acceptor. *J. Biol. Chem.* Vol. 255, No. 23, 11268-11272
- [48] Jensen, J. W. and Schutzbach, J. S. (1981). The Biosynthesis of Oligosaccharide-Lipids: Partial purification and characterization of Mannosyltransferase II. *J. Biol. Chem.* Vol. 256, No. 24, 12899-12904
- [49] Jensen, J. W. and Schutzbach, J. S. (1982). The Biosynthesis of Oligosaccharide-Lipids: Activation of Mannosyltransferase II by specific phospholipids. *J. Biol. Chem.* Vol. 257, No. 15, 9025-9029
- [50] Johnson, A. E. and Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 799-842
- [51] Karaoglu, D., Kelleher D. J., Gilmore, R. (1997). The highly conserved *Stt3* Protein Is a Subunit of the Yeast Oligosaccharyltransferase and Forms a Subcomplex with *Ost3p* and *Ost4p*. *J. Biol. Chem.* 272, 32513-32520
- [52] Karaoglu, D., Kelleher, D. J. and Gilmore, R. (2001). Allosteric Regulation Provides a Molecular Mechanism for Preferential Utilization of the Fully Assembled Dolichol-Linked Oligosaccharide by the Yeast Oligosaccharyltransferase. *Biochem* 40, 12193-12206
- [53] Kean, E. L. (1985). Stimulation by Dolichol Phosphate-Mannose and Phospholipids of the Biosynthesis of *N*-Acetylglucosaminylpyrophosphoryl Dolichol. *J. Biol. Chem.* Vol. 260, No. 23, 12561-12571
- [54] Kean, E. L., Rush, J. S. and Waechter, C. J. (1994). Activation of GlcNAc-P-P-Dolichol Synthesis by Mannosylphosphoryldolichol Is Stereospecific and Requires a Saturated α -Isoprene Unit. *Biochemistry* 33, 10508-10512
- [55] Kean, E. L. and Niu, N. (1998). Kinetics of formation of GlcNAc-GlcNAc-PP-dolichol by microsomes from the retina of the embryonic chick. *Glycoconjugate J.* 15, 11-17

- [56] Kean, E. L. *et al.* (1999). Regulation of the Biosynthesis of *N*-Acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol, Feedback and Product Inhibition. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No. 48, 34072-34082
- [57] Kelleher, D. J. *et al.* (2001) Large-scale isolation of dolichol-linked oligosaccharides with homogeneous oligosaccharide structures: determination of steady-state dolichol-linked oligosaccharide compositions. *Glycobiol.* Vol. 11 No. 4, 321-333
- [58] Kelleher, D. J. *et al.* (2003) Oligosaccharyltransferase Isoforms that Contain Different Catalytic STT3 Subunits Have Distinct Enzymatic Properties. *Molec. Cell* Vol. 12, 101-111
- [59] Kessi, J. *et al.* (1994). Short-Chain Phosphatidylcholines as Superior Detergents in Solubilizing Membrane Proteins and Preserving Biological Activity. *Biochem.* 33, 10825-10836
- [60] Ketala, T. *et al.* (1999). *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p Is a Potential Cell Wall Stress Sensor and Upstream Activator of the *PKC1-MPK1* Cell Integrity Pathway. *J. Bact.* Vol. 181, No. 11
- [61] Kim, H. *et al.* (2000). Studies on the role of the hydrophobic domain of Ost4p in interactions with other subunits of yeast oligosaccharyl transferase. *PNAS* Vol. 97, No. 4, 1516-1520
- [62] Kim, S. *et al.* (2000). Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie). *J. Clin. Invest.* 105, 191-198
- [63] Klis, F. M. *et al.* (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26, 239-256
- [64] Knauer, R. (1992). Biochemische Untersuchungen zur N-Oligosaccharyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae*: Solubilisierung, Rekonstitution und Charakterisierung interagierender Komponenten eines Enzymkomplexes. Diplomarbeit an der naturwiss. Fakultät III der Universität Regensburg.
- [65] Knauer, R. (1997). Biochemische und molekulargenetische Untersuchungen des N-Oligosaccharyltransferase-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation an der naturwiss. Fakultät III der Universität Regensburg.
- [66] Knauer, R., Lehle, L. (1999). The Oligosaccharyltransferase Complex from *Saccharomyces cerevisiae*. ISOLATION OF THE *OST6* GENE, ITS SYNTHETIC INTERACTION WITH *OST3*, AND ANALYSIS OF THE NATIVE COMPLEX. *J. Biol. Chem.* 274, 17249-17256
- [67] Knauer, R. and Lehle, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. Review. *BBA* 1426, 259-273
- [68] Knauer, R., Lehle, L. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of the *N*-Oligosaccharyltransferase Complex. In Ernst, B., Hart, G. W., Siany, P. (Hrsg.), *Carbohydrates in Chemistry and Biology*. Vol. III: *Biosynthesis and degradation of glycoconjugates*. Wiley-VCH Weinheim
- [69] Körner, C., Knauer, R. *et al.* (1998). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type V: Deficiency of dolichyl-P-Glc:Man₉GlcNAc₂-PP-dolichyl glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, 13200-13205

- [70] Körner, C., Lehle, L. and Figura, K. (1998). Abnormal synthesis of mannose 1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I fibroblasts with phosphomannomutase deficiency. *Glycobiology* Vol. 8, 165-171
- [71] Körner, C., Knauer, R. *et al.* (1999). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man₅GlcNAc₂-PP-dolichyl mannosyltransferase. *EMBO J.* Vol. 18 No. 23, 6816-6822
- [72] Kranz, C., Denecke, J., Lehrman, M. A., *et al.* (2001). A mutation in the human *Lec35/MPUDU1* gene causes Congenital Disorder of Glycosylation Type If (CDG-If). *J. Clin. Invest.* 108, No. 11, 1613-1619
- [73] Krauter, A. and Hildebrandt, H. (2003). Role of polysialic acid and the neural cell adhesion molecule NCAM in tumor cell growth. Eurotron Net-Conferences EGTM-5: „Glycosylation & Disease“ 01.09.03 at www.netconferences.net/eurotron/vwk/vwklibrary
- [74] Kukuruzinska, M. A. and Lennon-Hopkins, K. (1999). *ALG* gene expression and cell cycle progression. Review. *Biochim Biophys Acta* 1426, 359-372
- [75] Kyshe-Anderson, J. (1984). Electro blotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for a rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Meth.* 10, 201-209
- [76] Laemmli, U. K., and King, J. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- [77] Lechner, J. and Wieland, F. (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 173-194
- [78] Lehle, L. *et al.* (1995). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: *ngd29*, an *N*-glycosylation mutant allelic to *och1* having a defect in the initiation of outer chain formation. *FEBS Let.* 370, 41-45
- [79] Lehrman, M. A. (1991). Biosynthesis of *N*-acetylglucosamine-P-P-dolichol, the committed step of asparagine-linked oligosaccharide assembly. Review. *Glycobiol* Vol. 1 No. 6, 553-562
- [80] Leidich *et al.* (1994). A Conditionally Lethal Yeast Mutant Blocked at the First Step in Glycosyl Phosphatidyl-inositol Anchor Synthesis. *J. Biol. Chem.* Vol. 269, No. 14, 10193-10196
- [81] Leidich *et al.* (1995). Temperature-sensitive Yeast GPI Anchoring Mutants *gpi2* and *gpi3* Are Defective in the Synthesis of *N*-Acetylglucosaminyl Phosphatidyl-inositol. *J. Biol. Chem.* Vol. 270, No. 22, 13029-13035
- [82] Leidich, S. D. and Orlean, P. (1996). *Gpi1*, a *Saccharomyces cerevisiae* Protein That Participates in the First Step in Glycosylphosphatidylinositol Anchor Synthesis. *J. Biol. Chem.* Vol. 271, No. 44, 27829-27832
- [83] Lipke, P. N., Ovalle, R. (1998). Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J Bact* 180, 15, 3735-3740

- [84] Lodder, A. L., Lee, T. K. and Ballester, R. (1999). Characterization of the Wsc1 Protein, a Putative Receptor in the Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 1487-1499
- [85] Manzella, S. M., Hooper, L. V. and Baenzinger, J. U. (1996). Oligosaccharides Containing β 1,4-Linked *N*-Acetylgalactosamine, a Paradigm for Protein-specific Glycosylation. *J. Biol. Chem.* Vol. 271, No. 21, 12117-12120
- [86] Martín, H. *et al.* (2000). Regulatory Mechanisms for Modulation of Signaling through the Cell Integrity Slt2-mediated Pathway in *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275 No. 2 14, 1511-1519
- [87] Metzler, M. *et al.* (1994). Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development. *EMBO J.* Vol. 13, 2056-2065
- [88] Niehues, R. *et al.* (1998). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J. Clin. Invest.* 101, 1414-1420
- [89] Nilsson, I. and von Heijne, G. (2000). Glycosylation Efficiency of Asn-Xaa-Thr Sequons Depends Both on the Distance from the C Terminus and on the Presence of a Downstream Transmembrane Segment. *J. Biol. Chem.* Vol. 275, No. 23, 17338-17343
- [90] Nilsson, I. *et al.* (2003). Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J. Cell. Biol.* Vol. 161, No. 4, 715-725
- [91] Palamarczyk, G., Lehle, L. and Tanner, W. (1979). Polyprenyl Phosphate prevents Inactivation of Yeast Glycosyl Transferase by Detergents. *FEBS Lett.* 108, 111-115
- [92] Park, H. and Lennarz, W. J. (2000). Evidence for interaction of yeast protein kinase C with several subunits of oligosaccharyl transferase. *Glycobiol.* Vol. 10 No. 7, 737-744
- [93] Parodi, A. J. (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* 348, 1-13
- [94] Philip, B. and Levin, D. E. (2001). Wsc1 and Mid2 Are Cell Surface Sensors for Cell Wall Integrity Signaling That Act through Rom2, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rho1. *Mol. Cell. Biol.* 21 No. 1, 271-280
- [95] Pringle, J. R. (1991). Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* 194, 732-735
- [96] Revers, L., Wilson, I. B. H., Webberley, S. L. and Flitsch, S. L. (1994). The potential dolichol recognition sequence of β -1,4-mannosyltransferase is not required for enzymic activity using phytanyl-pyrophosphoryl- α -*N,N'*-diacetylchitobioside as acceptor. *Biochem. J.* 299, 23-27
- [97] Rodríguez-Peña, J. M. *et al.* (2000). A Novel Family of Cell Wall-Related Proteins Regulated Differently during the Yeast Life Cycle. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 20 No. 9, 3245-3255
- [98] Rothstein, R. J. (1983). One-Step Gene Disruption in Yeast. *Meth. Enzymol.* 101, 202-211
- [99] Rush, J. S. and Waechter, C. J. (1995). Transmembrane movement of a water-soluble analogue of mannosylphosphoryldolichol is mediated by an endoplasmic reticulum protein. *J. Cell Biol.* 130, 529-536

- [100] Rush, J. S. and Waechter, C. J. (1998). Topological studies on the enzymes catalyzing the biosynthesis of Glc-P-dolichol and the triglucosyl cap of Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-dolichol in microsomal vesicles from pig brain: use of the processing glucosidases I/II as latency markers. *Glycobiology* 8, 1207-1213
- [101] Sasak, W. *et al.* (1984). Biosynthesis of Dolichyl Pentasaccharide Diphosphate in Calf Pancreas Microsomes. *J. Biol. Chem.* Vol. 259, No. 1, 332-337
- [102] Sauer, N. and Stolz, J. (1994). *SUC1* and *SUC2*: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. *Plant J.*, 6, 67-77
- [103] Schenk, B., Imbach, T. *et al.* (2001). MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation designated type If. *J. Clin. Invest.* 108, No. 11, 1687-1695
- [104] Schutzbach, J. S., Springfield, J. D. and Jensen, J. W. (1980). The Biosynthesis of Oligosaccharide-Lipids: Formation of an α -1,2-Mannosyl-Mannose Linkage. *J. Biol. Chem.* Vol. 255, No. 9, 4170-4175
- [105] Schutzbach, J. S. and Zimmermann, J. W. (1992). Yeast dolichyl-phosphomannose synthase – reconstitution of enzyme activity with phospholipids. *Biochem. Cell Biol.* 70, 460-465
- [106] Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.* John Wiley & Sons
- [107] Shakin-Eshleman, S. H. *et al.* (1996). The Amino Acid at the X Position of an Asn-X-Ser Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core-glycosylation Efficiency. *J. Biol. Chem.* Vol. 271, No. 11, 6363-6366
- [108] Sharma, C. B., Lehle, L. and Tanner, W. (1981). N-Glycosylation of Yeast Proteins. Characterization of the Solubilized Oligosaccharyl Transferase. *Eur. J. Biochem.* 116, 101-108
- [109] Sharma, C. B., Lehle, L. and Tanner, W. (1982). Solubilization and Characterization of the Initial Enzymes of the Dolichol Pathway from Yeast. *Eur. J. Biochem.* 126, 319-325
- [110] Sharma, C. B., Knauer, R. and Lehle, L. (2001). Biosynthesis of Lipid-Linked Oligosaccharides in Yeast: the *ALG3* Gene Encodes the Dol-P-Man:Man₅GlcNAc₂-PP-Dol Mannosyltransferase. *Biol. Chem.* Vol. 382, 321-328
- [111] Snider, M. D. and Rogers, O. C. (1984). Transmembrane Movement of Oligosaccharide-Lipids during Glycoprotein Synthesis. *Cell* Vol. 36, 753-761
- [112] Tadashi, T. *et al.* (1975). Structural Studies of Two Ovalbumin Glycopeptides in Relation to the Endo- β -N-acetylglucosaminidase Specificity. *J. Biol. Chem.* Vol. 250, No. 21, 8569-8575
- [113] Thiel, C., Schwarz, M. *et al.* (2002). Deficiency of dolichyl-P-Man:Man₇GlcNAc₂-PP-dolichyl mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ig. *Biochem. J.* 367, 195-201
- [114] Thiel, C., Schwarz, M. *et al.* (2003). A new type of Congenital Disorders of Glycosylation (CDG-II) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 25, 22498-22505

- [115] Valls, L. A., Hunter, C. P., Rothman, J. H., Stevens, T. H. (1987). Protein Sorting in Yeast: The Localization Determinant of Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Resides in the Propeptide. *Cell* 48: 887-897
- [116] Van Schaftingen, E. and Jaeken, J. (1995). Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett.* 377, 318-320
- [117] Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Review. *Glycobiology* Vol. 3, No. 2, 97-130
- [118] Verostek, M. F., Atkinson P. H. and Trimble, R. B. (1993). Glycoprotein Biosynthesis in the *alg3 Saccharomyces cerevisiae* Mutant. I. Role of glucose in the initial glycosylation of invertase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* Vol. 268, No. 16, 12095-12103
- [119] Verostek, M. F., Atkinson P. H. and Trimble, R. B. (1993). Glycoprotein Biosynthesis in the *alg3 Saccharomyces cerevisiae* Mutant. II. Structure of novel Man₆₋₁₀GlcNAc₂ processing intermediates on secreted invertase. *J. Biol. Chem.* Vol. 268, No. 16, 12104-12115
- [120] Vijayraghavan, U., Company, M. and Abelson, J. (1989). Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 3, 1206-1216
- [121] Wacker, M. *et al.* (2002). N-linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and Its Functional Transfer into *E. coli*. *Science* Vol. 298, 1790-1793
- [122] Wiederer, O. (1986). Charakterisierung und hormonelle Regulation der adipogenen Konversion von Rattenpräadipozyten in Primärkultur. Dissertation an der naturwiss. Fak. III der Universität Regensburg
- [123] Wong-Madden, S. T. and Landry D. (1995). Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas*. *Glycobiology* Vol. 5 No. 1, 19-28
- [124] Wood, P. J. (1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 85, 271-287
- [125] Xiaohua, W. *et al.* (2003). Deficiency of UDP-GlcNAc:Dolichol Phosphate N-Acetylglucosamine-1 Phosphate Transferase (DPAGT1) Causes a Novel Congenital Disorder of Glycosylation Type Ij. *Human Mutation* 22, 144-150
- [126] Yamashita, K. *et al.* (1980). Structural Studies of the Sugar Chains of Human Parotid α -Amylase. *J. Biol. Chem.* Vol. 255, No. 12, 5635-5642
- [127] Yan, Q. and Lennarz, W. (1999). Oligosaccharyltransferase: A Complex Multisubunit Enzyme of the Endoplasmic Reticulum. *Biochem Biophys Res Comm* 266, 684-689

Wissenschaft

ist ein Friedhof

toter Ideen.

Miguel de Unamuno

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zu allererst bei **Herrn Prof. Dr. L. Lehle** bedanken. Er stand neuen Ideen stets sehr offen gegenüber und nahm sich viel Zeit für kritische Diskussionen. Insbesondere im zweiten Zeitabschnitt der Arbeit genoß ich große Freiheit – und Unterstützung, wann immer sie notwendig war. Dies trug wesentlich bei zur erfolgreichen Bearbeitung dieses vielschichtigen und interessanten Themas.

Diese Arbeit ist ein \LaTeX -Produkt – und wäre ohne Microsoft kaum zustande gekommen, wäre da nicht die unermüdliche Hilfe von **Frau Dr. Andrea Straßer** gewesen. Sie brachte es fertig, aus mir einen Linux- und \LaTeX -Begeisterten zu machen. Und die außergewöhnliche Freundschaft zu ihr hat mir in einer entscheidenden Phase viel Kraft und neue Perspektiven gegeben. Dafür möchte ich ihr ganz herzlich danken.

Den Anfang der Arbeit leitete **Dr. Roland Knauer** an. Seine hohe Kompetenz, sein Humor und die gemeinsame Begeisterung für Musik ließen diese Zeit zu einem besonderen Abschnitt werden.

Besonders viel gelernt habe ich von **Prof. Dr. C. B. Sharma** während seiner Anwesenheit im Herbst 2001. Er ist ein geduldiger Lehrer, der mich an seinem enormen Erfahrungsschatz in Sachen Membranzymen und Zuckerlipiden bereitwillig teilhaben ließ. Mit ihm zusammen im Labor zu arbeiten war ein Vergnügen, und sein Wissen hat mir sehr geholfen.

Ein ständiger Austausch nicht nur wissenschaftlicher Art fand beinahe täglich mit **Herrn PD Dr. Eckhard Loos** statt. Seine kompromißlos aufrichtige Art gepaart mit einem außergewöhnlich breit fundierten Wissen, stetem Interesse an meiner Arbeit und sein analytisches Hinterfragen scheinbar selbstverständlicher Dinge ließen mich Manches aus einem anderen Blickwinkel betrachten. Und so mancher Gang zur Mensa war nicht zuletzt von botanischem Nährwert. Aber auch politische Diskurse, Gespräche über Musik oder private Dinge möchte ich nicht missen. Danke!

Dr. Stefan Knauss war immer hilfsbereit und ein äußerst kompetenter und kritischer Ansprechpartner. In Sachen PCR konnte ich mir durch seine Ratschläge manche Irrläufer ersparen. Und als Musiklexikon auf zwei Beinen erschloß sich mir durch ihn viel Unbekanntes. Vielen Dank dafür!

Ohne **Frau Angelika Rechenmacher** wäre für mich die Zeit im „Labor Lehle“ unvorstellbar. Ihre menschliche Anteilnahme und die vielen guten Ratschläge waren für mich sehr wichtig – um nichts weniger ihre Kompetenz und Gewissenhaftigkeit.

Entnervt von der Zellkultur kam sie mir schließlich zu Hilfe, worauf der einsame Frust an der Sterilbank abgelöst wurde von viel Galgenhumor, guten Gesprächen und hervorragender Zusammenarbeit – wenigstens aus meiner Perspektive. Vielen Dank ganz besonders für die *alg2*-Komplementations-Experimente zum CDG-Ii und die Präparation von Spheroblastenmembranen!

Vielen Dank an meinen Lehrmeister in allen Dingen, die mit der Zellkultur zusammen hängen, **Herrn Dr. Helfried Mallow**. Er nahm sich bei Fragen oder Problemen immer Zeit für mich. Ebenso **Frau Dr. Petra Schling**, unter deren Ägide es mir erlaubt war, das heilige Blutwunder zu erleben...

Auch bei denen, die in letzter Zeit zum „Lehle-Labor“ gestoßen sind – **Katrin Hese**, **Tanja Bickel** und **Peter Hauptmann** – möchte ich mich für ihre Unterstützung und die höchst angenehme Atmosphäre sehr herzlich bedanken.

Danke auch an **Nicole Kirner**, die bei uns Forschungspraktikum machte und mit ihren Experimenten zur Glykosylierung von Mid2p in $\Delta ost6$ meine schönste Theorie vernichtete...

Und nicht zuletzt bei den vielen anderen, die durch ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beitrugen: Bei **Herrn Dr. Thomas Schödl**, bei **Frau PD Dr. Sabine Strahl** – nicht nur, sondern auch – für die Rundum-Information zu Mid2p, bei **Frau Dr. Verena Girrbach** für die große Hilfsbereitschaft im Allgemeinen, ihre Beratung in Sachen Schägger-Gelen und die unermüdliche Organisation unserer Ski-Tage und bei **Herrn Dr. Tobias Willer**.

Ganz besonders aber möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt und mir Mut gemacht haben, wenn ich ihn besonders nötig hatte – und Ulyana, die mir in der letzten Zeit eine stete Motivationsquelle war!

Regensburg, den 02. November 2003

Markus Schwarz